

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК
ГРНТИ
Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:
Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»
От имени Руководителя организации _____/ <u>Иванов А.О.</u> ____/ М.П.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении 3 этапа Государственного контракта
№ П2364 от 18 ноября 2009 г. и Дополнению от 02 апреля 2010 г. № 1/П2364,
Дополнению от 27 июля 2010 г. № 2, Дополнению от 09 марта 2011 г. № 3

Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»
Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.2 Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук.
Проект: Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений.
Руководитель проекта: _____/Киселева Ирина Сергеевна (подпись)

Екатеринбург
2011 г.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ
по Государственному контракту П2364 от 18 ноября 2009 на выполнение поисковых
научно-исследовательских работ для государственных нужд

Организация-Исполнитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Руководитель темы:

кандидат биологических наук, доцент	_____	Киселева И. С.
	подпись, дата	

Исполнители темы:

доктор географических наук, старший научный сотрудник	_____	Борисова Г. Г.
	подпись, дата	

кандидат биологических наук, без ученого звания	_____	Малева М. Г.
	подпись, дата	

кандидат биологических наук, без ученого звания	_____	Чукина Н. В.
	подпись, дата	

без ученой степени, без ученого звания	_____	Ермошин А. А.
	подпись, дата	

без ученой степени, без ученого звания	_____	Фазлиева Э. Р.
	подпись, дата	

без ученой степени, без ученого звания	_____	Кислицина М. Н.
	подпись, дата	

без ученой степени, без ученого звания	_____	Синенко О. С.
	подпись, дата	

кандидат биологических
наук, доцент

подпись, дата

Некрасова Г. Ф.

без ученой степени, без
ученого звания

подпись, дата

Ушакова (Шабурова) О. С.

Реферат

Отчет 92 с., 8 ч., 20 рис., 4 табл., 67 источн., 0 прил.

трансгенный табак , стеролы , абиотический стресс , биотический стресс. , антиоксидантные системы , ген HMG1 , фотосинтетический аппарат , Неспецифическая устойчивость

В отчете представлены результаты исследований, выполненных по 3 этапу Государственного контракта № П2364 "Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений." (шифр "НК-421П") от 18 ноября 2009 по направлению "Коллоидная химия и поверхностные явления" в рамках мероприятия 1.2.2 "Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук.", мероприятия 1.2 "Проведение научных исследований научными группами под руководством докторов наук и кандидатов наук", направления 1 "Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий." федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы.

Цель работы - изучение на примере трансгенных моделей роли гена *hmg1* в жизнедеятельности растительного организма, в частности, в формировании неспецифической устойчивости

Для выполнения цели и задач 3 этапа использованы методы: 1. Спектрофотометрические с использованием спектрофотометра UV-VIS PD 303 UV "APEL" (Япония) для определения активности ферментов окислительного стресса - СОД (Beauchamp, Fridovich, 1971), пероксидазы (Chance, Maehly, 1955), каталазы (Aebi, 1971); определение интенсивности ПОЛ по накоплению ТБК-реагирующих продуктов; анализ содержания пролина по реакции с нингидрином (Bates, 1973); аскорбиновой кислоты и глутатиона (Починок, 1975), SH-соединений по реакции с ДТНБ (Ellman, 1959). Содержание стеролов оценивали по Кондюк, 2002 после их разделения методом тонкослойной хроматографии. Определение активности ферментов окислительного стресса и антиоксидантов проводили в трех-пяти биологических повторностях. Для оценки достоверности различий использовали критерий Манна–Уитни. Достоверность результатов оценивали при уровне значимости $p < 0.05$. 2. С использованием микроскопа тринокулярного МТ 4000 с цифровой видеокамерой CAM V-400 (Япония) и программным обеспечением "SIAMS MESO PLANT" 610 оценивали структуру мезофилла листа трансгенных растений табака. 3. Определение интенсивности фотосинтеза у трансгенных растений табака определяли с использованием портативной системы изучения газообмена GFP 3000 (Германия). 4. Идентификацию трансгенных растений, содержащих

гетерологичный ген *hmg1*, осуществляли путем обнаружения маркерного и целевого гена методом ПЦР с использованием стандартного оборудования лаборатории ДНК-анализа. 5. Получение и селекцию трансгенных томатов и картофеля осуществляли путем агробактериальной трансформации с последующей селекцией растений на среде с антибиотиками и ПЦР диагностикой трансгенной вставки.

1. Ресурсы научной библиотеки, в т.ч. доступ к электронным документам (статьи, патенты, базы данных). 2. Собственные экспериментальные данные и методические разработки; 3. Материально-техническая база: цифровой UV-VIS спектрофотометр PD 303 UV “APEL”; микроскоп тринокулярный MT 4000 с цифровой видеокамерой CAM V-400 и программным обеспечением “SIAMS MESO PLANT” 610; центрифуга с охлаждением 318K “Sigma”; комплект оборудования для лаборатории ДНК-анализа, включая амплификатор, твердотельный термостат, камеру для электрофореза с источником питания, гель-документатор, трансиллюминатор и др.; портативная система для изучения газообмена растений GFP 3000, комплексная лаборатория биотехнологии растений.

Материалы теоретических и экспериментальных исследований, раскрывающие содержание работ по решению поставленных научно-исследовательских задач (объем XX п.л.), включая:

- аналитический отчет о проведении теоретических и (или) экспериментальных исследований;
- отчет по обобщению и оценке результатов исследований;

В результате проведения исследований:

- выявлены механизмы устойчивости к разным стрессовым факторам (таким как тяжелые металлы, кислые газы, органические поллютанты, водный стресс и др.) у растений из природных местообитаний в условиях длительного стресса, а также их семенного потомства в нормальных условиях и при стрессе, что позволило определить характер приспособлений – адаптация (наследуется) или акклимация (не наследуется);
- исследованы особенности функционирования фотосинтетического аппарата, включая способность к ассимиляции CO₂, накопление пигментов, активность фотосинтетических ферментов, особенности метаболизма углерода у растений из естественных местообитаний в градиенте техногенной нагрузки, а также в модельных экспериментах;
- исследовано участие антиоксидантных систем, включая активность ферментов окислительного стресса (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и др.), синтез SH- соединений, органических кислот, аскорбата и др. в обеспечении устойчивости растений к поллютантам и другим стрессовым факторам;
- определены границы применимости метода мезоструктуры фотосинтетического аппарата для целей изучения неспецифической

устойчивости растений;

- изучены ответные реакции модельных растений – трансгенного табака *Nicotiana tabacum* с встроенным геном *hmg1* в смысловой и анти-смысловой ориентации на стрессовые воздействия с целью уточнения роли гена *hmg1* в формировании механизмов неспецифической устойчивости растений;
- созданы методики и методология комплексной оценки неспецифической устойчивости растений.

Содержание

<i>Введение.....</i>	<i>9</i>
<i>1 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на I и II этапах.....</i>	<i>15</i>
<i>2 Аналитический отчет о проведении теоретических и экспериментальных исследований «Изучение на примере трансгенного табака роли гена hmg1 в формировании неспецифической устойчивости растений»</i>	<i>19</i>
<i>2.1 Природные изопреноидные соединения. Многообразие путей биосинтеза природных изопреноидных соединений.</i>	<i>20</i>
<i>2.2 Ранние стадии биосинтеза изопреноидов в высших растениях</i>	<i>24</i>
<i>2.3 Гены, кодирующие 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу</i>	<i>27</i>
<i>2.4 Направленное ингибирование экспрессии эукариотических генов</i>	<i>28</i>
<i>2.6 Влияние экспрессии гетерологичного гена hmg1 на организацию фотосинтетического аппарата листа табака.....</i>	<i>31</i>
<i>2.7 Содержание фотосинтетических пигментов в листьях трансгенных растений.....</i>	<i>34</i>
<i>2.8 Содержание суммы стеренов в тканях трансгенных линий табака</i>	<i>35</i>
<i>2.9 Устойчивость растений к стрессовым факторам.....</i>	<i>37</i>
<i>2.9.1 Устойчивость к фитопатогенам.....</i>	<i>37</i>
<i>2.9.2 Реакция трансгенов табака на окислительный стресс, вызванный паракватом</i>	<i>40</i>
<i>2.10 Влияние гена hmg1 на репродуктивную сферу растений.....</i>	<i>42</i>
<i>2.11 Получение трансгенных растений картофеля и томатов с геном hmg1</i>	<i>48</i>
<i>3 Отчет по обобщению и оценке результатов исследований по проблеме «Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений»</i>	<i>55</i>
<i>3.1 Модели и методология проведения научных исследований по проблеме «Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений»</i>	<i>56</i>
<i>3.2 Рекомендации по использованию материалов исследования «Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений»</i>	<i>58</i>
<i>4. Публикации результатов НИР.....</i>	<i>60</i>

<i>Заключение</i>	<i>87</i>
<i>Список используемых источников</i>	<i>92</i>

Введение

В настоящее время изменение качеств окружающей среды, связанное с усиливающимся давлением антропогенного фактора в биосфере, затрагивает все среды жизни. Вопросы устойчивости живых систем к антропогенным факторам имеют исключительную важность. И сам человек, и другие живые организмы вынуждены переживать неблагоприятное действие этих факторов, проявляя акклимации или адаптации к ним.

Живые системы, обладая способностью к саморегуляции, приспосабливаются к изменяющимся условиям среды. Приспособления могут быть сформированы в ходе эволюционного процесса (при длительном воздействии измененного (нового) фактора). Такие приспособления закрепляются генетически. Это – адаптации. Однако и при кратковременных воздействиях в пределах нормы реакции организмы приспосабливаются к новым условиям. Такого рода приспособления возникают в результате изменения экспрессии генов или изменения активности метаболических систем – это акклимации. И те, и другие приспособительные реакции затрагивают сферу метаболических процессов. Приспособления возникают в результате изменения экспрессии генов или изменения активности метаболических систем.

Растения играют в биосфере планеты особую роль, трансформируя солнечную энергию в формы, доступные другим живым организмам, продуцируя органическое вещество и молекулярный кислород. Они важны для человечества как источник пищи, корма для сельскохозяйственных животных, сырье для традиционных и биотехнологий.

Исследование механизмов неспецифической устойчивости растений важно для решения в будущем многих технологических вопросов, в частности, детоксикации методами фиторемедиации наземной и водной среды, сохранения урожая сельскохозяйственных культур путем создания трансгенных форм, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессорам; сохранения генофонда дикорастущих и культурных растений в условиях климатических изменений и загрязнения окружающей среды.

К антропогенным факторам живые организмы, в том числе растения, эволюционно не приспособлены. Установлено, что эти факторы сужают пределы толерантности растений, то есть уменьшают их устойчивость к естественным факторам (температуре, влажности и др.). Поэтому исследование механизмов устойчивости растений к техногенному воздействию является исключительно важным и актуальным.

В имеющейся мировой и российской литературе вопрос об устойчивости растений

к стрессорам различной природы рассматривается постоянно. Многочисленные исследования, выполненные разными авторами, касаются, как правило, кратковременных воздействий (часы, сутки, месяцы) факторов на растения. При этом нельзя однозначно ответить на вопрос, являются ли наблюдаемые под воздействием стрессоров изменения модификациями или они связаны с адаптивными, закрепленными генетически изменениями.

Существует много сведений об антиоксидантных системах клеток и их активации при стрессе. Установлено, что, как правило, при стрессовом воздействии факторов в клетках живых организмов развиваются процессы окислительного стресса, вызванные генерацией активных форм кислорода (АФК). Этот процесс – неспецифическая ответная реакция живой системы на неблагоприятное воздействие. АФК обладают высокой реакционной способностью и нарушают течение многих процессов в клетке, а также ее структуры, например мембраны, вызывая перекисное окисление липидов.

В клетках существуют антиоксидантные системы, осуществляющие «гашение» АФК и, следовательно, предотвращающие повреждения клеток. Эти системы включают в себя как низкомолекулярные антиоксиданты (пролин, аскорбат, глутатион, органические кислоты, фитостерины и др.), так и специфические защитные белки клетки, богатые SH-группами. Исследование особенностей функционирования антиоксидантных систем важно для понимания того, как растения адаптируются к антропогенно измененным условиям среды. Это знание позволит в будущем решать многие технологические вопросы, касающиеся восстановления качеств среды методами фиторемедиации наземной и водной среды; формирования высокой продуктивности и качества сельскохозяйственных растений путем создания генетически модифицированных форм, устойчивых к стрессорам различной природы; сохранения биоразнообразия дикорастущих и культурных растений в условиях климатических изменений и загрязнения окружающей среды.

Вопросам устойчивости растений к стрессорам различной природы уделено большое внимание исследователей в области биологии растений. Тем не менее, имеется большой круг вопросов, которые пока не имеют решения. В частности, недостаточно обсуждается вопрос об изменении структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата как одного из путей формирования неспецифической устойчивости растений. Не до конца ясно, как взаимосвязаны между собой различные элементы протекторных систем растений. Кроме того, преобладающее количество исследований выполнено в модельных условиях на ограниченном круге объектов, например, арабидопсис, табак, элодея и другие и касаются, как правило, кратковременных

воздействий (часы, сутки, месяцы) факторов. Растения дикой флоры изучены в гораздо меньшей степени.

Для более точного и полного понимания процессов, затрагивающих приспособление растений к стрессовым факторам удобно использовать такие модели, как трансгенные растения, у которых изменен, например, метаболизм важных соединений, вовлеченных в формирование неспецифической устойчивости. Таким модельным объектом, например, могут быть растения с гетерологичным геном *hmg1*, имеющие измененный метаболизм изопреноидов.

Изопреноиды – один из крупнейших и многофункциональных классов вторичных метаболитов –. В настоящее время он насчитывает более 20 тысяч индивидуальных веществ и с каждым годом этот список расширяется. К классу изопреноидных соединений относятся многие растительные гормоны (фитогормоны) – абсцизовая кислота, гиббереллины, брассиностероиды, цитокинины. Молекулы, связанные с основным метаболизмом растений, такие как каротиноиды, фитол хлорофиллов, стерины мембран, убихиноны и пластохиноны также имеют изопреноидную природу. Соединения специфического обмена веществ: стероидные гликоалкалоиды, сесквитерпеновые фитоалексины и фитонциды, изопрен, компоненты эфирных масел и другие – тоже принадлежат классу изопреноидов.

В растениях существует два метаболических пути синтеза изопреноидов – ацетатно-мевалонатный, локализованный в цитоплазме клетки и эритрозофосфатный, реализующийся в хлоропласте. До сих пор не известно достоверно, насколько данные пути могут взаимодействовать друг с другом, могут ли они обмениваться интермедиатами, способен ли один заменить другой.

Для решения данной проблемы удобно применение генно-инженерных методов, позволяющих направленно ингибировать или усиливать экспрессию ключевых генов определённого метаболического пути.

Изучение ацетатно-мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов представляет особый интерес в связи с тем, что через данный метаболический путь синтезируются фитогормоны цитокинины, брассиностероиды и стерины мембран, участвующие в регуляции роста и развития растений, а также в формировании неспецифической устойчивости к стрессорам различной природы. Кроме того, из мевалоновой кислоты образуются сесквитерпены, многие из которых являются фитоалексинами и аттрактантами, а так же возможно имеют и антиоксидантную функцию.

Знакомство с литературой по устойчивости растений к разного рода стрессорам показывает, в проблеме механизмов адаптации растений остается много вопросов.

Целью данного проекта было выявление роли фотосинтетического аппарата в формировании механизмов неспецифической устойчивости растений к стрессовым воздействиям.

Для этого у наземных и водных растений из естественных местообитаний с разным уровнем техногенной нагрузки, их семенного потомства в природных условиях и модельном эксперименте исследованы: структура фототрофных тканей листа, содержание фотосинтетических пигментов, функциональная активность фотосинтетического аппарата листьев (ассимиляция CO₂, накопление поллютантов), активность прооксидантных систем и антиоксидантных ферментов, содержание высоко- и низкомолекулярных антиоксидантов. Изучены популяций наземных растений, которые на протяжении многих десятков лет подвергались техногенному воздействию, и, следовательно, адаптированы к этим условиям. Представлены результаты модельных экспериментов и исследований растений из техногенно нарушенных экосистем. Изучение устойчивости проведено как с использованием растений из природных популяций, так и их семенного потомства, выращенного в условиях благоприятного экофона.

Использование гидрофитов в качестве объектов позволило определить особенности формирования ответных реакций растений на стрессоры в водной среде обитания. Способность водных растений накапливать тяжелые металлы в значительных количествах, образуя нетоксичные комплексы, свидетельствует о высокой устойчивости гидрофитов к повышенным концентрациям металлов и открывает широкие перспективы для их использования в ремедиационных технологиях.

В число объектов исследования включены трансгенные формы табака с встроенным в смысловой и антисмысловой ориентации геном *hmg1*, кодирующим одну из ключевых реакций синтеза изопреноидов у растений. Как известно, изопреноиды играют в растительном организме важную роль, являясь фитогормонами, каротиноидами, фитостеринами, фитоалексинами, компонентами эфирных масел и т.д.

В качестве стрессоров будут рассмотрены тяжелые металлы, кислые газы выбросов металлургических предприятий, органические загрязнители, обезвоживание растений.

Широкий спектр объектов, комплексный подход (физиологические, биохимические, анатомические исследования) в оценке реакций растений на стрессовые факторы различной природы, сочетание полевого и лабораторного эксперимента, работы с растениями в условиях длительного и кратковременного загрязнения, с исходными формами и их семенным потомством, трансгенными растениями позволили оценить значение функциональных и структурных перестроек фотосинтетического аппарата

растений при адаптации к стрессовым условиям. Эти знания в перспективе могут способствовать развитию технологического форсайта в области биотехнологии, инновационного сельского хозяйства, сохранения биоразнообразия растений, восстановления качества окружающей среды.

Проект реализован в три этапа.

Цель I этапа исследований: изучение анатомо-морфологических и физиолого-биохимических изменений фотосинтетического аппарата листьев растений при действии техногенных стрессоров как возможного пути формирования их неспецифической устойчивости.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить особенности мезоструктурной организации листьев наземных и водных растений в природных популяциях с разным уровнем антропогенной нагрузки;
2. Определить содержание фотосинтетических пигментов в листьях наземных и водных растений из естественных местообитаний, различающихся уровнем техногенного загрязнения;
3. Изучить возможность наследования адаптивных изменений параметров фотосинтетического аппарата, используя в качестве модели семенное потомство растений из разных по уровню техногенной нагрузки условий, выращенное в условиях благоприятного экофона;
4. В условиях модельного эксперимента исследовать способность гидрофитов к накоплению тяжелых металлов, а также особенности пигментных систем при действии разных тяжелых металлов.

Решение этих задач полностью выполнено, что позволило получить информацию об изменении фотосинтетического аппарата растений как элементе общей системы неспецифической устойчивости растений, включая такие параметры, как структура фототрофных тканей и пигментные системы растений.

Цель II этапа проекта: исследование антиоксидантных систем листьев растений и их роли в формировании устойчивости растений к техногенным поллютантам в природных и модельных системах.

Для реализации цели были поставлены задачи:

1. Изучить активность ферментов окислительного стресса (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и др.) у наземных и водных растений в норме и при воздействии поллютантов;
2. Выявить изменения содержания SH-соединений, органических кислот, аскорбата

и других низкомолекулярных антиоксидантов у растений при стрессе, вызванном техногенными поллютантами;

3. Изучить ответные реакции трансгенного табака *Nicotiana tabacum* со встроенным геном *hmg1* в смысловой и анти-смысловой ориентации на стрессовые воздействия с целью уточнения роли гена *hmg1* в формировании механизмов неспецифической устойчивости растений;

4. Оценить роль антиоксидантных систем растений в адаптации и акклимации растений к техногенным поллютантам.

Цель III этапа - изучение на примере трансгенных моделей роли гена *hmg1* в жизнедеятельности растительного организма, в частности, в формировании неспецифической устойчивости.

Раскрытие цели предусматривало следующие задачи:

1. Проанализировать имеющуюся научную литературу о биосинтезе, разнообразии и функциях изопреноидов в растении, о роли гена *hmg1* в биосинтезе мевалоновой кислоты и разнообразии веществ, образующихся из неё.

2. Провести изучение фотосинтетических характеристик листа, включая структуру мезофилла, содержание пигментов и интенсивность фотосинтеза у полученных методом агробактериальной трансформации трансгенных линий растений *Nicotiana tabacum*.

3. Определить у них содержание стероидов в разных органах.

4. Изучить устойчивость полученных линий к биотическим и абиотическим стрессовым факторам.

5. Изучить особенности генеративной сферы растений.

6. Провести анализ наследования трансгенной вставки в первом семенном поколении.

1 Аннотированная справка по научным результатам НИР, полученным на I и II этапах

Целью I и II этапов исследований было изучение анатомо-морфологических и физиолого-биохимических изменений фотосинтетического аппарата листьев растений при действии техногенных стрессоров как возможного пути формирования их неспецифической устойчивости, а также антиоксидантных систем и их роли в формировании устойчивости растений к техногенным поллютантам. Для достижения цели были проведены экспериментальные исследования, в которых определены параметры мезоструктуры листа, содержание фотосинтетических пигментов, функциональная активность фотосинтетического аппарата листьев (ассимиляция CO_2 , накопление поллютантов), активность антиоксидантных систем (низкомолекулярные антиоксиданты, ферменты окислительного стресса) у широкого круга объектов: 9 видов наземных и 10 видов высших водных растений в условиях стрессовых воздействий. Уровень стресса оценивали по перекисному окислению липидов. Были использованы наземные и водные растения из естественных местообитаний, отличающихся уровнем антропогенной нагрузки, а также семенное потомство этих растений в природных условиях и модельном эксперименте. То есть, был осуществлен комплексный подход к достижению заявленных целей и задач I и II этапов.

Анализ результатов исследования позволил сделать следующие выводы:

1. Тенденции в изменении пигментных систем наземных и водных растений в природных популяциях, отличающихся типом и степенью загрязнения их местообитания и семенного потомства этих растений, выращенного в условиях одинакового экофона без признаков загрязнения, одинаковы.

2. Изменения структуры фототрофных тканей листа несколько различны для разных видов растений и типов загрязнения. У семенного потомства растений, произраставших в условиях сильного техногенного загрязнения, существуют некоторых компенсаторные механизмы, связанные с изменением внешней и внутренней ассимилирующей поверхности, что позволяет им успешно фотосинтезировать и выживать в импактной зоне.

3. Выявленные особенности фотосинтетического аппарата растений могут быть наследственно закреплены, так как проявляются у семенного потомства, выращенного в условиях одинакового экофона в отсутствии изучаемых поллютантов. То есть, изменения, произошедшие в фотосинтетическом аппарате растений, являются адаптациями (отобраны в ряду поколений), а не акклимацией, которая может быть устранена при удалении

стрессора.

4. Наземные и водные растения, происходящие из местообитаний с высоким уровнем техногенного воздействия, обладают большей устойчивостью к поллютантам разной природы, что проявляется в более низком уровне перекисного окисления липидов, по сравнению с растениями из незагрязненных или мало загрязненных местообитаний.

5. Растения из импактных зон обладают более высокой активностью антиоксидантных ферментов: СОД и/или каталазы и пероксидазы. Аналогичные отличия отмечены для семенного потомства ряда наземных растений (горицвет, подорожник)

6. Растения при стрессе, вызванном поллютантами, способны накапливать большее количество SH-соединений и низкомолекулярных антиоксидантов.

Таким образом, в условиях хронического загрязнения окружающей среды у изученных видов травянистых растений разной систематической и биоморфологической принадлежности и у ряда гидрофитов в градиенте нагрузки происходят существенные изменения на разных уровнях организации – клеточном, тканевом, целого листа, организменном. Данные изменения можно рассматривать как защитно-приспособительные реакции. Выявлен ряд закономерностей, характеризующих взаимосвязь компонентов антиоксидантных систем растений с их устойчивостью. Эти реакции растений на стресс представляют собой общие неспецифические механизмы защиты растений. Изучение антиоксидантных систем у растений из природных биотопов, различающихся по степени загрязнения, и у их семенного потомства позволяет различить акклимации и адаптивные изменения у растений при развитии окислительного стресса при воздействии техногенными факторами.

Научная новизна исследований состоит в следующем:

1. Для понимания механизмов адаптации растений к техногенному загрязнению впервые был применен комплексный подход, состоящий в изучении процессов на организменном, тканевом, клеточном и биохимическом уровнях организации.

2. Впервые использована методология исследования, состоящая в сочетании полевого и модельного лабораторного эксперимента; изучения растений в естественных условиях произрастания на разном расстоянии от источников эмиссий и их семенного потомства в условиях вегетационного и лабораторного опыта с использованием выровненного экофона.

3. Впервые применен метод анализа мезоструктуры фотосинтетического аппарата к выявлению адаптаций растений к техногенному загрязнению у широкого круга объектов.

4. Впервые использован комплексный методический подход, сочетающий в себе изучение анатомо-морфологических (мезоструктура фототрофных тканей) и физиолого-

биохимических (рост, ассимиляция CO₂, содержание фотосинтетических пигментов, накопление тяжелых металлов, активность ферментов окислительного стресса, накопление антиоксидантов и др.) параметров, что позволило определить широкий набор показателей, характеризующих адаптации растений на различных уровнях организации к условиям загрязнения.

5. Впервые проведено сравнение изменений, возникающих в фотосинтетическом аппарате растений (пигментные системы и структура фототрофных тканей) у широкого круга объектов – дикорастущих видов наземных и высших водных растений при действии поллютантов. Показано, что у всех исследованных видов (включая растения из естественных местообитаний и их семенное потомство) имеются компенсаторные изменения мезофилла листа (структура фототрофных тканей, содержание пигментов), позволяющие ему нормально фотосинтезировать в условиях загрязнения кислыми газами, тяжелыми металлами, органическими поллютантами. Предполагается, что эти изменения генетически обусловлены и носят наследственный характер.

6. Впервые изучение антиоксидантных систем у растений из природных биотопов, различающихся по степени загрязнения, и у их семенного потомства позволило различить акклимации и адаптивные изменения у растений при развитии окислительного стресса при воздействии техногенными факторами.

7. Впервые выявлены физиолого-биохимические отличия по устойчивости к стрессу у трансгенных растений табака с геном *hmg1*.

Установленные в ходе исследования закономерности изменения структурно-функциональных признаков листьев растений под влиянием техногенных стрессовых факторов частично восполняет недостаток информации об изменении фотосинтетического аппарата растений как возможного пути формирования их неспецифической устойчивости. Изучение ответных реакций растений на токсическое действие токсичных веществ и механизмов адаптации, в том числе тех, которые наследуются, перспективно в направлении поиска генов, обеспечивающих общую и специфическую устойчивость растений к поллютантам и для прогноза последствий воздействия различных уровней загрязнения для биологических систем. Полученные сведения могут быть полезны для разработки методов диагностики устойчивости растений к поллютантам и осуществления скрининговых исследований растений с целью обнаружения пригодных для целей фиторемедиации видов.

Материалы исследований содержат элементы новизны, проявляющиеся как в постановке задач, так и в получении оригинальных данных, например, по выявлению

адаптаций и акклимаций у семенного потомства, Материалы исследования по уровню сопоставимы с лучшими Российскими, а по ряду моментов мировыми практиками.

Материалы исследований включены в учебно-методические материалы для студентов, обучающихся на направлениях «биология», «экология и природопользование», специальности «биотехнология».

В дальнейшем материалы исследования будут использованы для разработки и проведения скрининговых исследований по выявлению растений с высокой устойчивостью к техногенным поллютантам в целях фиторемедиации, фиторекультивации и других технологий, сберегающих и восстанавливающих окружающую среду; тест-системы для поиска растений, уникальных по свойству устойчивости. В будущем их можно будет использовать как источники ценных генов, обеспечивающих устойчивость культурных растений к техногенной среде.

2 Аналитический отчет о проведении теоретических и экспериментальных исследований «Изучение на примере трансгенного табака роли гена hmg1 в формировании неспецифической устойчивости растений»

Биотехнология является одной из наиболее быстро развивающихся областей человеческой деятельности. Среди разных направлений биотехнологии генетическая инженерия растений занимает особое место. Генная инженерия позволяет решать как фундаментальные научные задачи, связанные с ролью отдельных генов или метаболических путей в жизни живой клетки, так и прикладные, например создание сельскохозяйственных форм с повышенной продуктивностью, улучшенными пищевыми и вкусовыми качествами, устойчивостью к болезням и патогенам.

Растения характеризуются удивительно богатым вторичным метаболизмом. Один из крупнейших и многофункциональных классов вторичных метаболитов – изопреноиды. В настоящее время он насчитывает более 20 тысяч индивидуальных веществ и с каждым годом этот список расширяется. К классу изопреноидных соединений относятся многие растительные гормоны (фитогормоны) – абсцизовая кислота, гиббереллины, брассиностероиды, цитокинины. Молекулы, связанные с основным метаболизмом растений, такие как каротиноиды, фитол хлорофиллов, стерины мембран, убихиноны и пластохиноны также имеют изопреноидную природу. Соединения специфического обмена веществ: стероидные гликоалкалоиды, сесквитерпеновые фитоалексины и фитонциды, изопрен, компоненты эфирных масел и другие – тоже принадлежат классу изопреноидов.

В растениях существует два метаболических пути синтеза изопреноидов – ацетатно-мевалонатный, локализованный в цитоплазме клетки и эритрозофосфатный, реализующийся в хлоропласте. До сих пор не известно достоверно, насколько данные пути могут взаимодействовать друг с другом, могут ли они обмениваться интермедиатами, способен ли один заменить другой.

Изучение ацетатно-мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов представляет особый интерес в связи с тем, что через данный метаболический путь синтезируются фитогормоны цитокинины, брассиностероиды и стерины мембран, участвующие в регуляции роста и развития растений, а также в формировании неспецифической устойчивости к стрессорам различной природы. Кроме того, из мевалоновой кислоты образуются сесквитерпены, многие из которых являются фитоалексинами и аттрактантами, и, возможно имеют и антиоксидантную функцию., следовательно, вовлечены в формирование устойчивости растений.

2.1 Природные изопреноидные соединения. Многообразие путей биосинтеза природных изопреноидных соединений.

Изопреноидами (терпеноидами) называют самый многочисленный класс природных соединений, углеродный скелет которых построен из разветвленных C₅-единиц, называемых изопреновыми единицами. Изопреноиды повсеместно распространены среди живых организмов, как эукариот, так и прокариот. Они объединяются в один класс по биогенетическому признаку, поскольку ведут свое начало из единого предшественника – изопентенилдифосфата (ИПДФ).

Без участия изопреноидов невозможны такие процессы как рост и развитие растений и животных, поскольку многие низко гормоны растений (гиббереллины, абсцизовая кислота, брассинолиды) и животных (стероидные, половые гормоны и гормоны коры надпочечников) относятся к этому классу соединений. Изопреноидные фрагменты входят в состав фотосинтетических пигментов (фитол, каротиноиды) и переносчиков электронов (пренильные боковые цепи убихинонов, пластохинона). Изопреноиды участвуют в биосинтезе полисахаридов (полипренилфосфаты), стабилизируют внутриклеточные мембраны (стерины у эукариот, фитаноиды и гопаноиды у бактерий). Однако большая часть известных к настоящему времени изопреноидов относится к веществам специализированного (вторичного) обмена растений, которые участвуют в процессах сигнализации, защиты от фитопатогенов. Многие антибиотики, фитоалексины, репелленты, токсины имеют изопреноидную структуру (Harborn, 1991).

По-видимому, основная роль изопреноидов, специфичных для определенных семейств, родов и видов растений (это главным образом моно-, сескви-, ди-, сестер- и тритерпеноиды), сводится к защите растений от различных неблагоприятных воздействий окружающей среды, в том числе от макро- и микровредителей (Пасешниченко, 1991). Пути биосинтеза изопреноидов изображены на рис.1. Большая физиологическая роль изопреноидов, а также разнообразие их структур вызвали значительный интерес к изучению путей их биосинтеза. В 1887 г. Валлах предложил основное “изопреновое правило”. Коротко суть его состоит в том, что многие природные соединения построены из изопреновых углеродных единиц и, следовательно, образуются, вероятно, путем полимеризации изопрена. Затем идеи, лежащие в основе этого правила, расширил Ружичка, сформулировав их как *биогенетическое изопреновое правило*. Он предположил, что все терпеноиды синтезируются из предшественника, названного “активным изопреном”. Это предположение нашло подтверждение, когда Линен идентифицировал это вещество как \square^3 -изопентенилпирофосфат (ИППФ). В 1956 г. Фолкерс показал, что

ключевым предшественником ИПФ является C₆-гидроксикислота - (3R)-мевалоновая кислота (Гудвин и Мерсер, 1986).

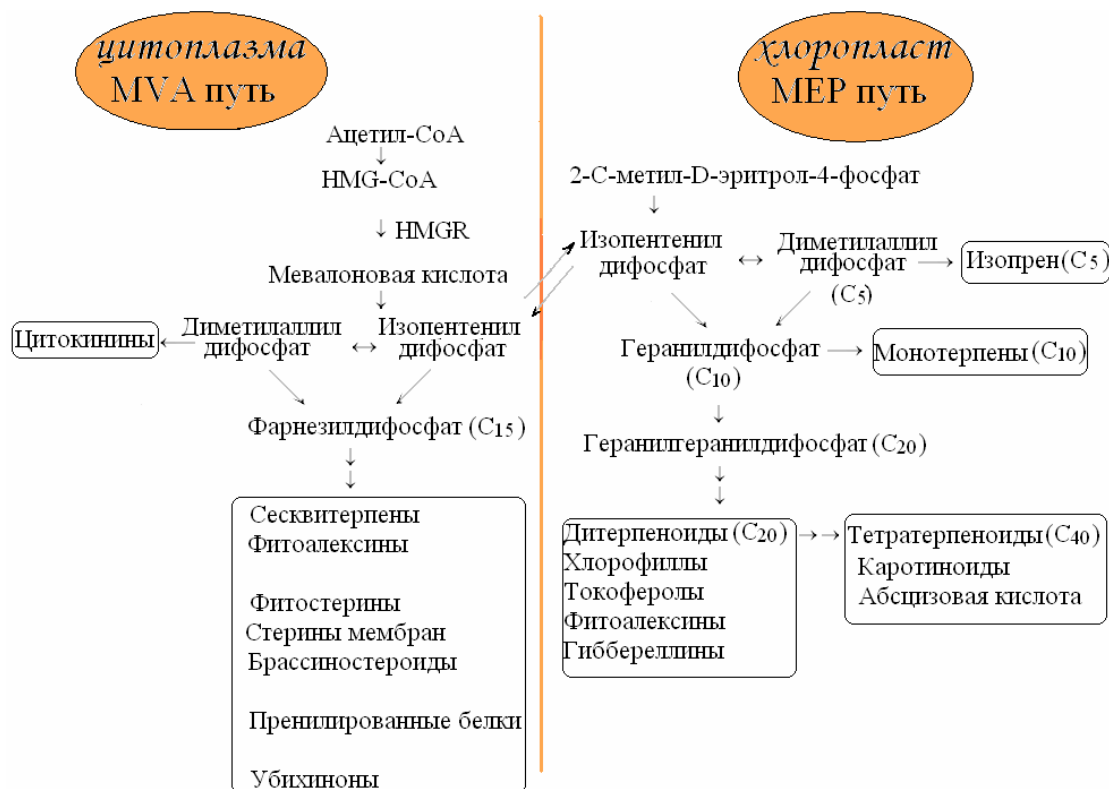


Рис.1. Пути биосинтеза изопреноидов в растительной клетке.

Начиная с 1956 г., когда была открыта мевалоновая кислота, и показано ее включение в холестерин в гомогенатах печени крысы, утвердилось общее представление, что у всех живых организмов изопреноиды образуются на ранних стадиях по единому мевалонатному пути (путь Блоха-Линена) (Linen, 1967). Этот путь, изученный *in vitro* на бесклеточных препаратах из печени и дрожжевых клетках, начинается с конденсации двух молекул ацетил-коэнзима А в ацетоацетил-КоА, который далее присоединяет еще одну молекулу ацетил-КоА с образованием ОМГК. Восстановление последнего с участием двух молекул НАДФН приводит к образованию МВК (□,□-дигидрокси-□-метилвалериановой кислоты). МВК после фосфорилирования по С-5 и последующего окислительного декарбоксилирования превращается в ИППФ – первый C₅-предшественник с разветвленным углеродным скелетом. ИППФ затем превращается во все известные природные терпены и терпеноиды.

Все ферменты, действующие на отдельных стадиях этого пути, были выделены и изучены на примере животных и растительных организмов (Spurgeon, 1981).

В 1982 г. Бах и Лихтенталер, используя выделенный из *Aspergillus terreus* метаболит мевинолин, который избирательно ингибирует 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу, показали необходимость этого фермента для нормального роста и развития как отдельных органов, так и целого растения. Эффект ингибирования роста не обращался добавлением гибберелловой кислоты, однако пропадал при внесении мевалоната – продукта реакции, катализируемой 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазой (Bach a. Lihtenthaller, 1982, 1983, 1984).

3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктаза [EC 1.1.1.88] катализирует NADPH-зависимую реакцию превращения 3-окси-3-метилглутарил-КоА, образуемого путем конденсации молекул ацетил-КоА в мевалоновую кислоту (МВК). Этот фермент (ОМГР) – ключевой, лимитирующий на данном этапе биосинтез изопреноидов. Практически у всех высших растений существуют множественные изоформы этого фермента, образующиеся как за счет множества кодирующих генов (семейства генов *hmg*), так и за счет альтернативного процессинга мРНК и посттрансляционной модификации (Learned a. Fink, 1989). Строение и топология ОМГР подробно изучена на примере *Arabidopsis thaliana* рядом авторов (Enjuto et al., 1994; Camposanol a. Boronat, 1995).

Несмотря на большое количество изоформ белка ОМГР, практически все, известные на сегодняшний день формы, связываются с митохондриальным ЭПР и синтезируют мевалоновую кислоту в цитозоле. Ряд авторов объясняет это тем, что включение белка в ЭПР требует специфического взаимодействия сигнальной последовательности с различными компонентами транслокационной системы (Rapoport, 1992), а так как сама система эволюционно высоко консервативна, то выбор внутриклеточной мембраны также становится специфичным (Prehn et al., 1987; Ng a. Walter, 1994; Wolin, 1994). В то же время фермент способен связываться с мембранами хлоропластов: на это указывает присутствие и чрезвычайно высокая активность ОМГР в хлоропластах *Stevia rebaudiana*, относящейся к семейству *Compositae*, обнаруженная Кимом с соавторами (Kim et al., 1995). В других растениях этого семейства подобной активности не наблюдалось. Уровень активности митохондриального пула ферментов ОМГР у всех растений семейства был одинаков.

Исследование биосинтеза изопреноидов в бактериальных культурах с мевалонатом в качестве единственного источника углерода выявило штамм *Arthrobacter*, у которого МВК, меченая по второму атому углерода, не использовалась для построения полипреноловых спиртов. В то же время в этих изопреноидах обнаруживали метку из [¹⁴C]-ИППФ (Takatsuji et al., 1983). Аналогичные данные были получены и на культуре *Escherichia coli* (Tujisaki et al., 1986).

При изучении ранних стадий биосинтеза убихинона у *E. coli* был сделан вывод, что убихинон-8 этих бактерий образуется из глюкозы через промежуточную стадию пирувата, и при этом не происходит смешения образующейся при его декарбоксилировании С₂-единицы с клеточным пулом ацетил-КоА (Zhou, 1991).

Эти и некоторые другие данные, противоречащие постулату о едином пути образования изопреноидов из МВК, получили объяснение в подробных исследованиях на нескольких видах эубактерий, проведенных под руководством Ромера.

Эксперименты с тремя видами грамотрицательных бактерий (*Rhodopseudomonas palustris*, *R. acidophila* и *Methylobacterium organophilum*), растущих на синтетических средах с ацетатом в качестве единственного источника углерода, выявили интересную картину ранних стадий биосинтеза тритерпеноидов гопанового ряда (Flesh et al., 1988). Было выяснено, что экзогенный ацетат не является их прямым предшественником. Исследования других видов бактерий - *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, также продуцирующих различные производные гопаноидов (бактериогопантетрола и диплоптерола), и штамма *E. coli* – продуцента убихинона-8, показали, что и у этих эубактерий ОМГК и МВК не образуются на ранних стадиях биосинтеза терпеноидов.

Применение в качестве предшественников изопреноидов препаратов глюкозы, ацетата, пирувата или эритрозы меченных ¹³С в различных положениях, позволило выяснить методом ЯМР-спектроскопии происхождение каждого углеродного атома в изопреноидах. Было установлено, что в ИПФ атомы С-3 и С-5 происходят из пирувата, а атомы С-1, С-2 и С-4 - из триозофосфата.

Эти данные позволили в 1993 г. предложить новый путь ранних стадий биосинтеза изопреноидов у эубактерий (Rohmer et al., 1993). Наблюдаемое распределение метки свидетельствовало о том, что изопреновый скелет формируется на начальных этапах из продуктов триозофосфатного и глиоксилатного циклов распада глюкозы.

Была предложена гипотетическая общая схема биосинтеза ИППФ у эубактерий. В соответствии с этой схемой продукт декарбоксилирования пирувата в виде (гидроксиэтил)-ТРР, конденсируется с глицеральдегид-3-фосфатом (или глицеральдегидом, образующимся при действии фосфатазы). В результате конденсации образуется первый С₅-предшественник, наиболее вероятно 1-дезоксиксилулозо-5-фосфат (Rohmer et al., 1996).

Открытие нового, немевалонатного пути на ранних стадиях биосинтеза изопреноидов у эубактерий стимулировало исследования в этой области применительно к растениям. Совместными работами по изучению биосинтеза изопреноидов в культуре

одноклеточной зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus*, выполненными под руководством Ромера и Лихтенталера, обнаружены четкие доказательства функционирования этого пути в клетках низших растений (Schwender et al., 1996). Предпосылкой для этих работ послужили исследования по действию антибиотика мевинолина на культуру *S. obliquus*. Мевинолин не влиял на рост, размножение и образование фотосинтетических пигментов этой зеленой водоросли, хотя ранее было четко установлено его блокирующее действие на биосинтез стероидов у высших растений (Bach et al., 1990).

Результаты, полученные на клетках водоросли *S. obliquus*, подтвердили установленные ранее для эубактерий факты, свидетельствующие о происхождении C₂-единицы, ведущей начало от C-5 и C-6 атомов глюкозы, из продукта декарбоксилирования пирувата. В свою очередь C₃ единица происходит из C-4, C-5 и C-6 атомов глюкозы и образуется из триозофосфата, продукта гликолитического пути распада глюкозы (Гудвин и Мерсер, 1986).

Распределение метки в изопреновой единице в экспериментах с меченым по первому атому углерода ацетатом, когда метку нашли только в C-4 атоме ИППФ, подтвердило роль триозофосфата как предшественника синтеза ИППФ. В этом случае триозофосфат мог бы образоваться из ацетата через промежуточную стадию щавелевоуксусной кислоты, которая затем превращается в [1-¹³C]-пируват и [1-¹³C]-глицериновый альдегид. Вследствие этого часть ИППФ, которая ведет начало от пирувата (C₂-единица), не должна быть меченой, что и показали данные ЯМР-спектроскопии (Schwender et al., 1996).

Количественные данные по обогащению ¹³C отдельных атомов C₅-единицы позволили предположить, что в гетеротрофной культуре водоросли *Scenedesmus* глюкоза расщепляется не только по гликолитическому пути, но и по окислительному пентозофосфатному пути.

2.2 Ранние стадии биосинтеза изопреноидов в высших растениях

В водоросли *Scenedesmus* альтернативный путь биосинтеза изопреноидов действует на ранних стадиях образования не только хлоропластных терпеноидов, но и при биосинтезе стероидов в цитоплазме. В связи с этим было оправданным предположение, что в высших растениях немевалонатный путь сохранился только в хлоропластах, где уже давно было показано прямое образование изопреноидов из фотосинтетически усвоенного ¹⁴CO₂ (Goodwin et al., 1963; Roger et al., 1969). В то же время, как было указано выше,

фитостерины в высших растениях образуются в цитоплазме по классическому ацетатно-мевалонатному пути, при этом их образование практически полностью подавляется ингибитором ОМГ-КоА редуктазы – мевинолином (Bach, 1986).

Отсутствие включения экзогенной МВК в основные пластидные терпеноиды, а также малую величину включения [^{14}C]-МВК в изопреноиды, относящиеся к вторичным метаболитам (Bach, 1995) в настоящее время можно было бы объяснить их образованием не из МВК, а новым немевалонатным путем из триозофосфатов (Shwender et al., 1996).

Это предположение подтверждается в ряде экспериментальных работ, выполненных на культурах растительных клеток. Так, в культуре клеток растения *Antennaria majus* под действием элиситоров происходит торможение роста и ингибирование биосинтеза фитостеринов. В опытах с [2- ^{14}C]-ацетатом и [2- ^{14}C]-МВК не наблюдалось включения метки в кумариновые пренилированные фитоалексины. На основании полученных в экспериментах *in vivo* и *in vitro* данных стало возможным предположить, что в культуре клеток растения *A. majus* цитозольный и пластидный пути биосинтеза не связаны друг с другом (Fulton et al., 1993).

Не исключается возможность переключивания ацетатно-мевалонатного и триозофосфатного путей, например, на уровне фарнезилпирофосфата, который в цитоплазме используется для биосинтеза стероидов, а в пластидах после конденсации с ИППФ – для синтеза каротиноидов и боковых цепей хлорофиллов и пренилхинонов (Bach, 1995).

Цикл работ по изменению автономии изопреноидного биосинтеза в хлоропластах в процессе их развития, вплоть до полной утраты этой автономии в зрелых хлоропластах, помогает объяснить видимые противоречия между присутствием в препаратах изолированных хлоропластов всех ферментов превращения МВК в ИППФ (Albrecht et al., 1994), и одновременным отсутствием включения экзогенной МВК в хлоропластные изопреноиды, характерные для очень молодых тканей. Наиболее вероятно, что в процессе развития хлоропластов не только изменяется проницаемость их оболочки для МВК (в сторону увеличения), но и способность превращать МВК в ИППФ.

На основании фактов, полученных при изучении биосинтеза монотерпенов и сесквитерпенов в секреторных железках листьев мяты перечной (*Mentha piperita*), было сделано предположение, что в секреторных клетках этого растения активно функционируют оба пути образования ИППФ, несмотря на отсутствие в них ферментов, необходимых для превращения ацетил-КоА в МВК: ОМГ-КоА синтазы и ОМГ-КоА редуктазы (McGaskill et al., 1995).

Одна из последних совместных работ, выполненных в лабораториях Лихтенталера

и Ромера, подвела черту под многолетней дискуссией об особенностях биосинтеза хлоропластных изопреноидов в высших растениях (Lichtenthaler et al., 1997). В экспериментах с гетеротрофно выращиваемыми культурами ткани моркови *Daucus carota*, ряски *Lemna gibba* и зародышей ячменя *Hordeum vulgare* применили в качестве предшественника изопреноидов $[1-^{13}\text{C}]$ -глюкозу, которую добавляли к питательным средам. Распределение метки ^{13}C в цитоплазматических стеринах соответствовало предсказанному на основании ацетатно-мевалонатного пути образования ИПФ. В то же время хлоропластные изопреноиды в культуре ткани этих растений образовывались другим альтернативным путем - из глицеральдегид-3-фосфата и пирувата. После выделения цитоплазматических фитостеринов, ситостерина и стигмастерина, метку ^{13}C нашли в тех положениях их углеродного скелета, которые соответствовали образованию исходного C_5 предшественника классическим ацетатно-мевалонатным путем: мечеными были атомы С-2, С-4 и С-5 молекулы ИППФ. В хлоропластных изопреноидах: β -каротине, лютеине, фитоле из хлорофиллов и пренильной боковой цепи пластохинона-9 метка ^{13}C была обнаружена в положениях, происходящих из атомов С-1 и С-5 молекулы ИППФ (Lichtenthaler et al., 1997). Это однозначно свидетельствовало о наличии в клетках высших растений двух альтернативных путей, одновременно функционирующих на начальных стадиях биосинтеза изопреноидов из образованной в процессе фотосинтеза глюкозы.

Цитоплазматический ацетатно-мевалонатный и хлоропластный глицеральдегидфосфат-пируватный пути различаются на ранних стадиях, а затем, начиная с образования C_5 -единицы (ИППФ), различия в ранних стадиях биосинтеза изопреноидов стираются. По-видимому, реакция наращивания изопреноидной цепи на C_5 единицу в результате присоединения ИПФ к аллилдифосфатам происходят в цитоплазме и хлоропластах по единому механизму (Пасешниченко, 1987).

Открытие Ромера с соавторами вызвало к жизни изучение альтернативных путей синтеза многочисленных физиологически значимых изопреноидов и вторичных метаболитов этого класса, установление роли МВК и ИПФ в биосинтезе отдельных изопреноидов. Следует учитывать, что альтернативный немевалонатный путь образования ИППФ требует значительно меньших энергетических затрат (в виде АТФ), чем ацетатно-мевалонатный путь. Эти исследования весьма интересны и в эволюционном плане, например при рассмотрении симбиотического происхождения растительных органелл. Для решения всех этих вопросов, представляющих большой интерес для биохимии и физиологии растений, потребуются в будущем значительные усилия.

2.3 Гены, кодирующие 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу

В последнее десятилетие работы по изучению генов, кодирующих 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазу, активно ведутся во многих лабораториях мира. Интерес исследователей вызван, прежде всего, важной ролью ОМГР в биосинтезе стероидов. За это время были изучены гены и/или последовательности кДНК, кодирующие ОМГР таких видов как арабидопсис (Learned a. Fink, 1989), томаты (Denbow et al., 1996), гевея (Chye et al., 1992), картофель (Choi et al., 1992). Показано, что ОМГР в растениях кодируется небольшим мультигенным семейством, в то время как в геноме животных обнаружена единичная копия гена *hmg*. Различными авторами сделаны попытки понять механизмы регуляции экспрессии генов *hmg*.

Изучение растительных генов семейства *hmg* началось после работ двух групп исследователей (Learned a. Fink, 1989; Caelles et al., 1989), которые независимо друг от друга в 1989 году клонировали ген *hmg1* из библиотеки кДНК *Arabidopsis thaliana*. Авторы приводят нуклеотидную последовательность этого гена. В обеих работах отмечается высокая консервативность С-концевого домена фермента, содержащего каталитический сайт, и гомологичность таковому дрожжей, человека, сирийского хомячка и дрозофилы, в отличие от варибельного N-концевого домена (Learned, 1989; Caelles et al., 1989).

Позднее было обнаружено наличие в *Arabidopsis thaliana* второго гена семейства *hmg* – *hmg2* (Enjuto et al., 1994). Оба гена имеют сходное строение и состоят из четырех экзонов и трех небольших интронов. Кодирующие области генов сходны, однако 5'- и 3'-концевые участки значительно различаются. В экспрессии генов семейства также наблюдаются определенные различия. мРНК *hmg1* обнаружена во всех тканях растения, в то время как локализация мРНК *hmg2* ограничена проростками, корнями и соцветиями, то есть зонами активных меристем (Enjuto et al., 1994).

Использование *hmg1 Arabidopsis thaliana* в качестве зонда позволило клонировать и определить нуклеотидную последовательность генов семейства *hmg Solanum tuberosum* – *hmg1*, *hmg2*, *hmg3*. Показана различная картина экспрессии этих генов в ответ на поранение и инокуляцию различными расами фитофторы. Это позволило авторам сделать вывод о наличии двух независимых каналов для биосинтеза стероидов и сесквитерпенов в тканях картофеля (Choi et al., 1992).

Данные о гетерологичной экспрессии генов семейства *hmg* подтверждаются работами с гевеей (Chye et al., 1992). Показано, что экспрессия гена *hmg3* не имеет тканевой специфичности, в то время как *hmg1* интенсивно экспрессируется в млечниках.

Экспрессия *hmg1* *Hevea brasiliensis* индуцируется этиленом, а *hmg3* конститутивно экспрессируется благодаря промотору, сходному с промоторами генов “домашнего хозяйства”. Таким образом, считают авторы, ген *hmg1* участвует в биосинтезе соединений, входящих в состав латекса, а *hmg3* в биосинтезе изопреноидов, необходимых для поддержания жизнедеятельности растения.

Позднее в работе Лернеда была продемонстрирована регуляция экспрессии гена *hmg1* уровнем освещенности (Learned, 1996). Автором было отмечено накопление большого количества мРНК *hmg1* в растениях *Arabidopsis thaliana*, культивируемых в темноте. При исследовании промотора гена *hmg1* путем создания конструкции *hmg1::uidA*, было показано, что в растениях, культивируемых на свету, сохранялся постоянный базовый уровень экспрессии гена. Однако при адаптации растений к условиям пониженной освещенности (после 24 часов культивирования в темноте) уровень экспрессии с промотора гена *hmg1* резко возрастал (Learned, Connolly, 1997). При этом наблюдалась обратная зависимость между уровнем экспрессии фьюжен-конструкции и возрастом органа. В молодых листьях уровень экспрессии нарастал более интенсивно и достигал более высоких значений, чем в старых, полностью сформировавшихся. В тканях корня не наблюдали зависимости уровня экспрессии гена от уровня освещенности. Авторами показано, что наблюдаемая реакция контролировалась на уровне транскрипции и опосредована элементами расположенными, в промоторе гена *hmg1*.

В контексте данного обзора наибольший интерес представляют работы, посвященные изучению совместной экспрессии нативного и интродуцированного генов в растениях. Введение активно транскрибируемого гена *hmg1* под контролем 35S промотора в растения *Arabidopsis thaliana* (Re et al., 1995) проявлялось в эффективном (в 40 раз) увеличении уровня мРНК 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы, однако авторам удалось обнаружить лишь незначительное (в 2 раза) увеличение ферментативной активности. Авторами высказано предположение о сложной многоуровневой системе контроля экспрессии гена *hmg1* в высших растениях, как на уровне транскрипции, так и трансляции.

2.4 Направленное ингибирование экспрессии эукариотических генов

Впервые о специфичном подавлении трансляции мРНК было заявлено в работе Пестки с соавторами (Pestka et al., 1984), показавшими ингибирующее действие антисмысловой РНК. Этот момент можно считать отправной точкой развития направления молекулярной биологии, посвященного разработке стратегий направленного

ингибирования экспрессии генов и получившего название реверсивная генетика. В классической генетике, как правило, изучаются случайные мутации всех генов организма и из них отбираются те, которые обуславливают какой-либо специфический признак. В обратной генетике начинают с клонирования нужного гена и в дальнейшем манипулируют им, для того чтобы получить информацию о его функциях. В арсенале обратной генетики имеется множество методических приемов ингибирования генов.

Ингибирование экспрессии гена на уровне транскрипции при помощи антисмысловой РНК основано на одном из основных свойств нуклеиновых кислот – комплементарности. Экспериментатору достаточно иметь в своем распоряжении небольшой фрагмент кДНК исследуемого гена, для быстрого и эффективного подавления экспрессии гена-мишени путем образования гетеродуплексов мРНК-асРНК. Сейчас этот метод является наиболее дешевой и универсальной стратегией ингибирования экспрессии генов (Вайнтрауб, 1990).

2.5 Объекты и методы исследований

Ранее в лаборатории биотехнологии растений УРАН ФИБХ (г. Пущино) были получены трансгенные растения табака с геном *hmg1* в прямой и обратной ориентациях относительно двойного вирусного промотора CaMV 35SS (Поройко, 2000). В дальнейших исследованиях использовали по три линии каждого варианта (A1, A2, A6, C1, C2, C4) трансгенных растений с геном *hmg1*, линии «трансгенного контроля» (pSS), полученные при трансформации «пустым» вектором, и контрольную нетрансгенную линию.

В работе использовали стерильно выращенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*, томата *Lycopersicon esculentum* cv. Вспышка, Балконное чудо, Джина, Субарктик и картофеля *Solanum tuberosum* cv. *Desire*.

Использовали среды: Микробиологическая среда LB, среда для культивирования растений – MC (Murashige a. Skoog, 1962),

Агробактерии (*Agrobacterium tumefaciens*) культивировали на питательной среде LB. Селекцию по маркерам резистентности обеспечивали добавлением в среду антибиотиков в концентрации: рифампицин - 100 мг/л, карбенициллин - 100 мг/л, канамицин - 50 мг/л.

Для ПЦР-анализа трансгенных растений ДНК выделяли из листовых дисков табака быстрым методом (Edwards et al., 1991). Реакционная смесь для ПЦР-анализа трансгенных растений содержала 0.5-1 мкг геномной ДНК исследуемых растений в качестве матрицы, 0.2 mM смеси дНТФ, реакционный буфер (Евроген, Москва), 2.5 ед. ДНК-полимеразы *Taq*

(Евроген, Москва) и по 0.25-1 мкМ каждого праймера. Реакцию проводили в объеме 25 мкл при следующих условиях: 94⁰С - 5 мин; 30 циклов: 94⁰С - 30 с, 60⁰С - 30 с, 72⁰С - 30 с, затем 72⁰С - 7 мин на амплификаторе MJ MINI (Bio-Rad, США).

Праймеры к гену *hmg1*: forward - atggatctccgtcggaggcc, revers – caaccttcggttagccatagga.

Праймеры к гену *nptIII*: forward - tattcggctatgactgggca, revers – gccaacgctatgtctgata.

Содержание стеринов определяли спектрофотометрически в неомыляемом остатке (Кандюк, 2002). Для этого 300 мг сухой растительной ткани заливали 10 мл 10% КОН в 70% этаноле, добавляли аскорбиновую кислоту на кончике шпателя и кипятили с обратным холодильником в течение часа, после чего добавляли 10 мл дистиллированной воды и трижды проводили экстракцию очищенным диэтиловым эфиром. Эфирные фракции объединяли, сушили в токе воздуха, досушивали до постоянного веса в термостате при температуре 60⁰С, затем растворяли остаток в хлороформе и окрашивали реактивом Бурхардта-Либермана (1 мл концентрированной серной кислоты + 19 мл уксусного ангидрида). Оптическую плотность растворов определяли спектрофотометрически, содержание стеринов – по калибровочной кривой, используя в качестве стандарта раствор стигмастерина («Serva»).

Содержание хлорофиллов а, b и каротиноидов в листьях определяли спектрофотометрически в этанольных (96%) экстрактах из гомогената ткани листа (Ермаков и др., 1987). Для этого 0.1 г свежих листьев растирали в фарфоровой ступке с небольшим количеством этанола, СаСО₃ и стекла. Растертую массу количественно переносили в пробирки, центрифугировали, процедуру повторяли до полного обесцвечивания осадка. Объем экстракта доводили до 10 мл. Содержание пигментов определяли по формулам и выражали в мг/г сухого веса или в мг/дм².

Параметры мезоструктуры листа определяли по стандартной методике (Мокроносов, Борзенкова, 1978) методом световой микроскопии (микроскоп Meiji, Япония, камера Vision v400, Австрия) с использованием программы SiamsMesoPlant. Использовали полностью сформированные листья средних ярусов, без симптомов хлороза и поражения вредителями. Мацерацию фиксированных в 70% этаноле листовых высечек диаметром 5 мм проводили в 1М соляной кислоте, число клеток считали в камере Горяева, срезы толщиной 40 мкм готовили с помощью микротомы с замораживающим столиком.

Фертильность пыльцы определяли ацетокарминовым методом, а также по активности дегидрогеназ (с помощью трифенилтетразолия) и по прорастанию на 5% агаризованной сахарозе (Паушева, 1991)

Препараты семяпочек готовили после мацерации и просветления завязей в 5% КОН

в течение 5 суток.

Содержание антоцианов в венчиках определяли спектрофотометрически после экстракции 1% соляной кислотой. Навеску отгибов венчиков (300 мг) экстрагировали в течении 40 минут при встряхивании и температуре 45°C в 10 мл 1% соляной кислоты, после чего фильтровали, доводили объём до прежнего и спектрофотометрировали при длине волны 510 нм и 657 нм. Концентрацию выражали в относительных оптических единицах на мл, с учётом поправки на неспецифическое поглощение $C(ед) = OD_{510} - 0,33 \cdot OD_{657} / мл$

Стресс толерантность трансгенных и контрольных растений определяли после обработки гербицидом паракватом и фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae*. Абиотический стресс вызывали, выдерживая диски растений в течении 2 ч в темноте и 18 ч на свету в растворе 1 мкМ параквата. Биотический стресс индуцировали, обрабатывая листовые диски ночной культурой бактерий и инкубируя их с патогеном 40 ч во влажной камере.

ПОЛ определяли по образованию цветного продукта с тиобарбитуровой кислотой (Uchiyama et al., 1978), пролин – в водном экстракте с нингидриновым реактивом (Bates et al., 1979), активность гваяколовой пероксидазы – по скорости окисления гваякола перекисью водорода (Chance, 1955).

Все реактивы отечественного производства, использованные в работе, имели квалификацию не ниже "хч". В работе использовали также агарозу фирмы "BioRad" (США); додецилсульфат натрия – "Serva" (ФРГ); трис-НСl "Sigma" (США); ЭДТА "Serva" (ФРГ); бромистый этидий "Serva (ФРГ)", тетразолиевый нитросиний "Sigma" (США), нингидрин "Serva" (ФРГ), гваякол Sigma" (США).

Для ПЦР анализа были использованы наборы реактивов и фермент производства Евроген (Москва).

Статистическую обработку результатов исследования проводили общепринятыми методами. Достоверность полученных результатов проверяли, используя непараметрический критерий Мана-Уитни (Лакин, 1990). Эксперименты проводили в 3-4-х биологических и 2-3-х аналитических повторностях.

2.6 Влияние экспрессии гетерологичного гена *hmg1* на организацию фотосинтетического аппарата листа табака

Растения являются автотрофными организмами, структура которых приспособлена к оптимальному выполнению функции фотосинтеза на всех уровнях организации. На

внутреннее строение фототрофных тканей может повлиять множество факторов, в том числе фитогормоны, факторы роста и т.д. Стерины являются продуктами основного, а не вторичного метаболизма растений и образуются в цитоплазме из мевалоновой кислоты, мы предположили, что экспрессия гетерологичного гена *hmg1* приведёт к изменению количества стерина в мембранах клеток. Кроме того, возможно изменение эндогенного уровня цитокининов и брассинотероидов, что должно оказать влияние на структуру мезофилла листа. Изменение в анатомии листа, в свою очередь, может приводить изменениям в интенсивности фотосинтеза, дыхания, транспирации растения, водоёмкости листа и его устойчивости к фитопатогенам.

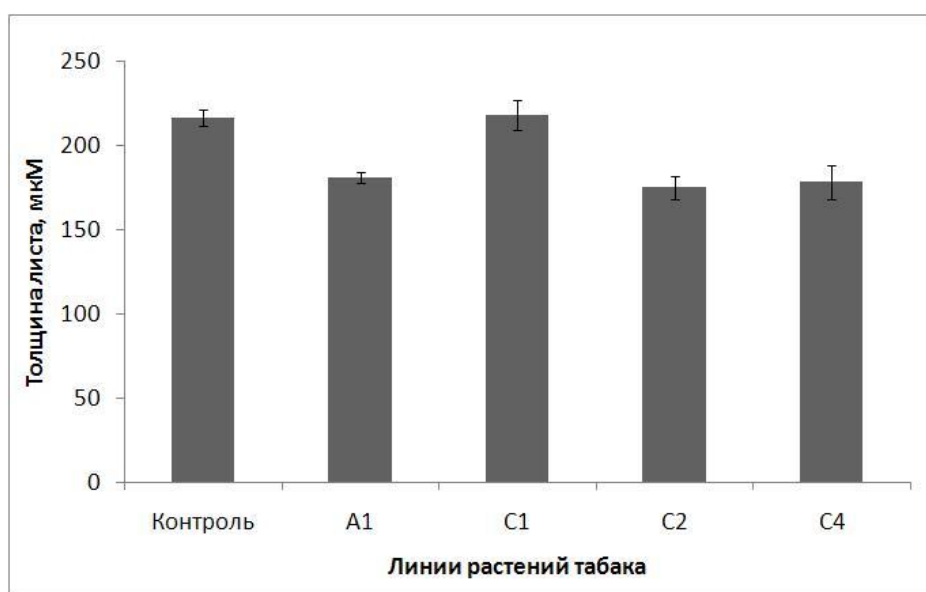


Рис.2. Толщина листа трансгенных линий

Для изучения параметров мезоструктуры листа были приготовлены поперечные срезы из центральной части листовой пластинки, исключая крупные жилки. Микроскопические исследования показали, что соотношение количества губчатых и столбчатых клеток мезофилла мало отличается у разных трансгенных линий между собой и в сравнении с контролем и близко к 1:1. Было отмечено, что лист табака очень рыхлый, содержит множество межклетников, клетки губчатого и столбчатого мезофилла по форме отличаются мало. Измерение толщины листа показало, что все линии трансгенных растений имеют немного меньшую толщину листа по сравнению с контролем, кроме линии C1. Отличия составили чуть более 12%, но были достоверны (рис. 2).

Подсчёт числа мезофильных клеток в тканевом мацерате показал, что антисмысловые линии имеют большее число клеток в единице площади листа, смысловые – сколько и контрольные, кроме линии C1 (рис. 3). Линия C1 возможно, отличается меньшим уровнем экспрессии гетерологичного гена *hmg1* (рис. 3). Измерение размеров

клеток листа показало, что смысловые линии имеют больший объем клеток губчатого мезофилла в сравнении с контрольной и антисмысловыми линиями. При этом объем клеток столбчатой паренхимы в линиях достоверно не отличался. В контрольном варианте и у линии A1 объем клеток губчатого и столбчатого мезофилла был практически одинаков, в то время как у других линий объем клеток губки был больше объема клеток палисада (рис.4).

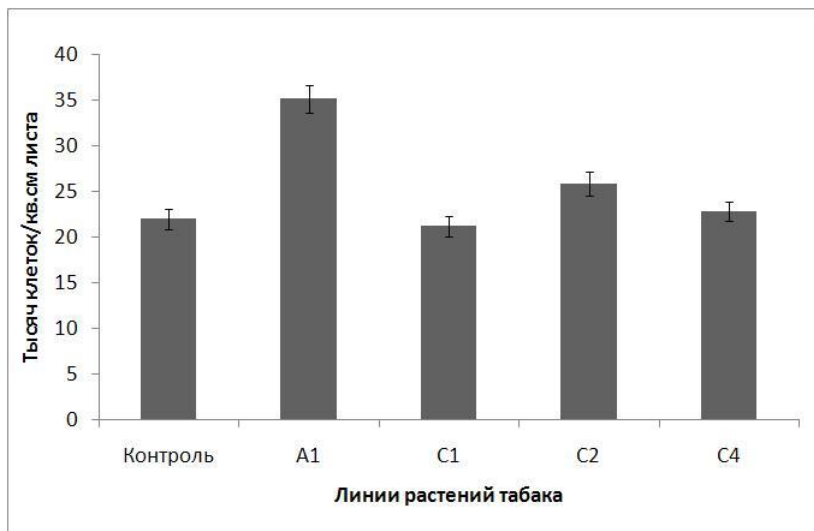


Рис.3. Количество клеток мезофилла в единице площади листа

Такие различия в объеме клеток и их числе в единице поверхности листа позволили предположить, что плотность упаковки клеток в листьях трансгенных линий больше, чем в контроле. Это могло быть обусловлено разными факторами. Для антисмысловых линий большая плотность упаковки объясняется уменьшением толщины листа и увеличением количества мезофильных клеток, а для смысловых линий - увеличением объема клеток, особенно губчатого мезофилла, при уменьшении толщины листа.

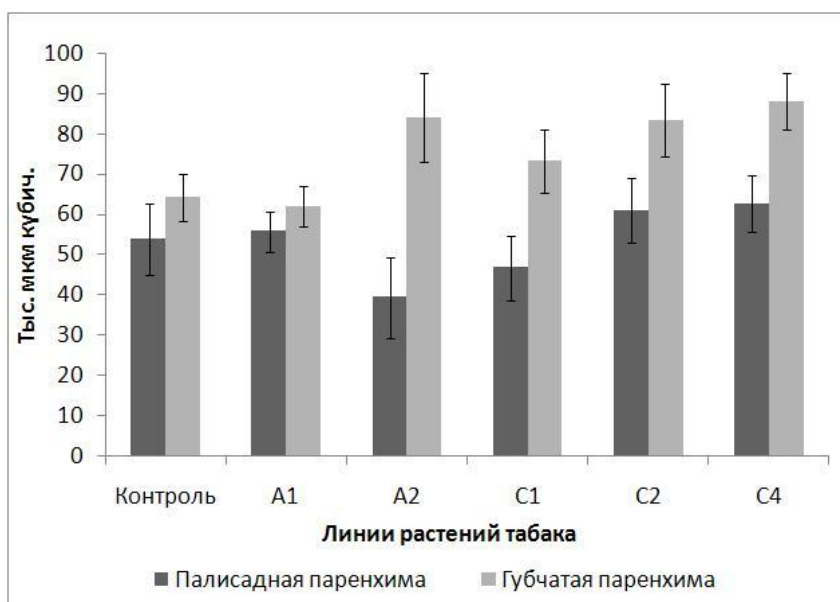


Рис.4. Объем клеток мезофилла

Данные по расчёту доли мезофилла в общем объёме листа и индекса мембран клеток представлены в таблице (табл. 1). Наше предположение, о более плотной упаковке клеток в мезофилле трансгенов, подтвердилось для всех вариантов, за исключением линии С1, которая отличалась несколько более рыхлыми листьями, чем другие линии. Однако наблюдаемые различия для линии С1 и контроля были недостоверны.

Таблица 1. Расчётные показатели мезоструктуры листа

Линия	Индекс мембран клеток	Доля мезофилла в объёме листа
Контроль	1.9	0.30
A1	3.0	0.46
C1	1.9	0.25
C2	2.5	0.40
C4	2.3	0.51

Таким образом, у трансгенных растений мы наблюдали увеличение внутренней ассимиляционной поверхности листа (ИМК) и доли мезофилла в нем. Эти два признака могут оказывать влияние на скорость диффузии газов в листе и, следовательно, скорость фотосинтеза, дыхания, транспирацию.

При определении количества устьиц на нижнем эпидермисе листа отличий между вариантами обнаружено не было. Наблюдаемые изменения мезоструктуры листа не повлияли на водоёмкость листа, интенсивность фотосинтеза, дыхания и транспирации растений (Ермошин и др., 2010).

2.7 Содержание фотосинтетических пигментов в листьях трансгенных растений

Другим фактором, который может определять уровень фотосинтеза у растений, является содержание фотосинтетических пигментов, которое, в свою очередь, определяется числом мезофильных клеток и хлоропластов в них. Каротиноиды и фитольный остаток хлорофиллов являются изопреноидами и образуются через эритрозофосфатный путь. Как указано выше, данный метаболический путь не может полностью компенсировать мевалонатный, и наоборот. Однако наблюдается незначительное включение меченого мевалоната в фотосинтетические пигменты (Пасешниченко, 1991). Кроме того, для растений табака показан значительный (до 15%) обмен интермедиатами между этими метаболическими путями (Ершов, 2005)

В наших исследованиях не обнаружены отличия в содержании каротиноидов и в соотношении хлорофиллов а/б. Суммарное содержание хлорофиллов изменялось с возрастом растений: до цветения не наблюдали отличий между контролем и антисмысловыми линиями, в смысловых линиях его содержание было достоверно больше на 10-15%; во время цветения содержание суммы хлорофиллов во всех линиях было одинаковым.

Таким образом, различия в содержании пигментов были незначительными (рис. 5) и сопоставимыми с интенсивностью обмена интермедиатами между метаболическими путями. С возрастом отличия нивелировались.

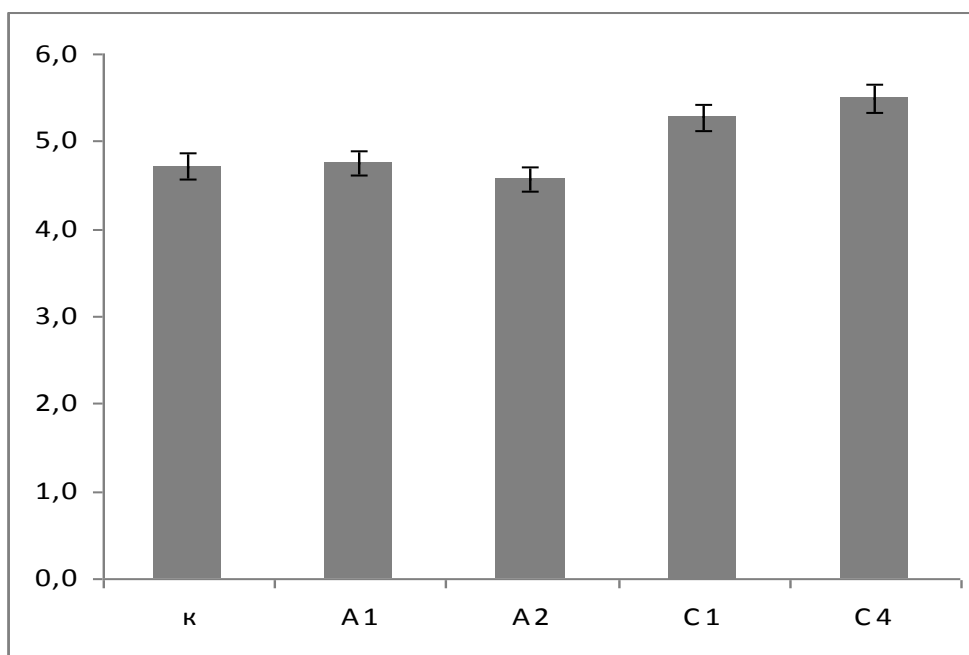


Рис.5. Содержание суммы хлорофиллов (мг/дм²) в листьях трансгенных растений до цветения

2.8 Содержание суммы стерина в тканях трансгенных линий табака

Поскольку стерин образуются в цитоплазме из мевалоновой кислоты, мы предположили, что в исследуемых линиях может происходить изменение их качественного и количественного состава. Для проверки данной гипотезы была проведена тонкослойная хроматография и спектрофотометрическое определение содержания суммы стерина в тканях исследуемых растений.

С помощью тонкослойной хроматографии показано, что отличий в качественном составе стерина в разных линиях растений, а так же в их разных частях не наблюдается (рис. 6).

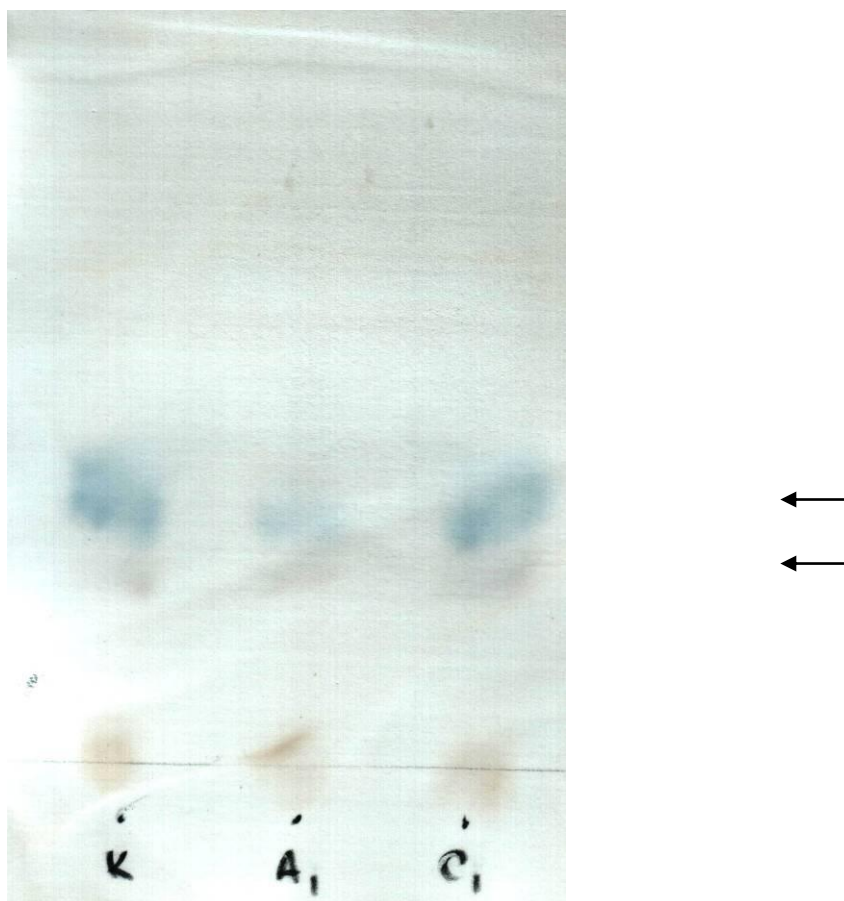


Рис.6. ТСХ неомыляемого остатка экстрактов листьев табака (контроль, линии A1 и C1) после проявления реактивом Бурхардта-Либермана. Система растворителей – гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (70:30:2). Видны пятна, соответствующие стигмастерину (нижняя стрелка) и β -ситостерину (верхняя стрелка).

Определение содержания стерина (компонентов, реагирующих с реактивом Бурхардта-Либермана) в неомыляемом остатке показало, что их количество в корнях растений после цветения у разных линий не отличается. Анализ суммы стерина в семенах показал, что семена всех смысловых линий с геном *hmg1* содержат их на 40-50% больше, чем контрольные. Уровень стерина в семенах антисмысловых линий не отличался от контроля. Результаты представлены в наших публикациях (Ермошин, 2011).

Исследование уровня стерина в тканях листа показало, что их содержание зависело от возраста растений и достигало максимума в зрелых тканях, что согласуется с литературными данными (Лутова, 2003). До цветения в листьях смысловых линий и контрольных растений наблюдали одинаковое количество стерина, тогда как в антисмысловых – на 10-15% меньше. В начале массового цветения растений уровень стерина в листьях антисмысловых линий достигал контрольного, а в смысловых начинал превосходить контрольный уровень на 50% (рис. 7).

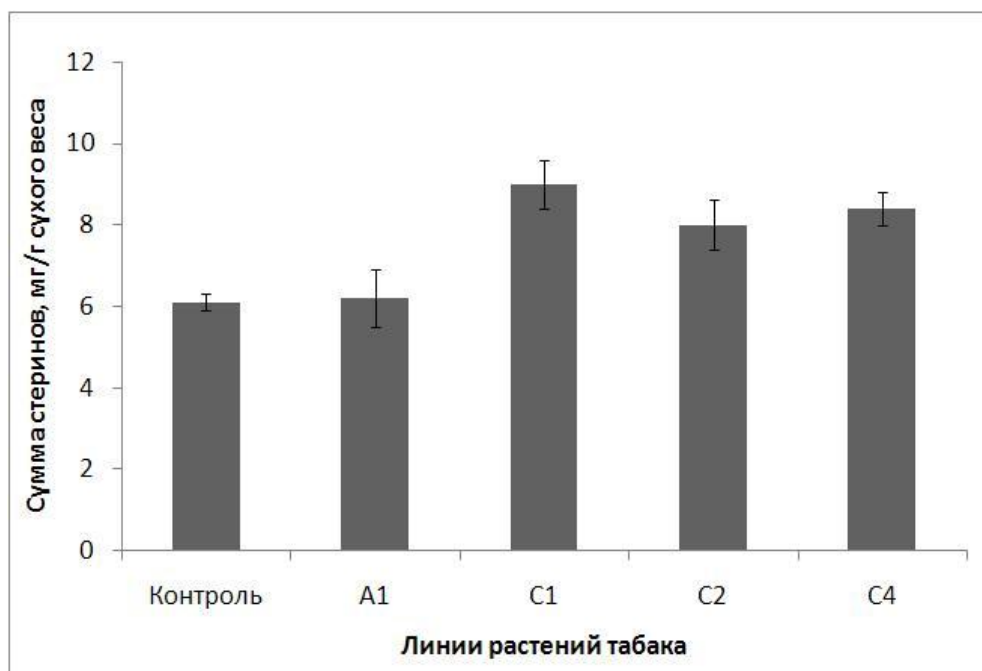


Рис.7. Содержание стероидов в тканях листа до цветения растений

2.9 Устойчивость растений к стрессовым факторам

Известно, что изменение содержания стероидов в растениях может оказывать влияние на их устойчивость к биотическим стрессам, на чувствительность растений к фитогормонам (Пасешниченко, 1991). Кроме того, на устойчивость растений к стрессам влияет уровень таких фитогормонов, как цитокинины и брассиностероиды. Все эти соединения синтезируются в клетке из мевалоновой кислоты. Изменение уровня данных фитогормонов может влиять на анатомию листа растений, что тоже сказывается на их чувствительности к стрессам.

Сесквитерпены также образуются в цитоплазме из мевалоновой кислоты. Некоторые из этих веществ являются фитоалексинами и повышают устойчивость растений к фитопатогенам. Кроме того, сесквитерпены содержат несколько двойных связей, часто сопряженных, поэтому они могут участвовать в тушении активных форм кислорода и тем самым повышать устойчивость растений и к абиотическим стрессорам.

2.9.1 Устойчивость к фитопатогенам

Как известно, некоторые сесквитерпены являются фитоалексинами. Поэтому растения с усиленным ацетатно-мевалонатным биосинтетическим путём могут быть более устойчивы к фитопатогенам. Ряд микроорганизмов, обладающих узким спектром хозяев,

являются ауксотрофными по биосинтезу стероидов и в отсутствии экзогенных фитостероидов значительно замедляют свой рост и теряют способность к половому размножению. Поэтому растения с антисмысловой копией гена *hmg1* могут приобрести устойчивость к некоторым фитопатогенам, например представители семейства *Solanaceae* – к *Phytophthora infestans*.

Мы оценивали устойчивость растений к фитопатогену широкого круга хозяев *Pseudomonas syringae*, предполагая, что растения с антисмысловой копией гена *hmg1* будут более восприимчивы к нему, а со смысловой – более устойчивы.

Показатели стресса оценивали по увеличению уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), увеличению содержания эндогенной перекиси водорода и уровню свободного пролина, а также по изменению активности СОД и гваяколовой пероксидазы.

По всем исследованным маркерам стресса линии с антисмысловой копией гена в сравнении с контролем не показали достоверных отличий в устойчивости к патогенам. Это может быть связано с недостаточным ингибированием ацетатно-мевалонатного биосинтетического пути у растений при использовании стратегии антисмысловых РНК.

Смысловые линии не показали увеличения содержания продуктов ПОЛ после стресса, тогда как в контроле рост составил более 70%. Это свидетельствует о том, что трансгенные линии не испытывают значительного стресса в отличие от контроля (рис. 8).

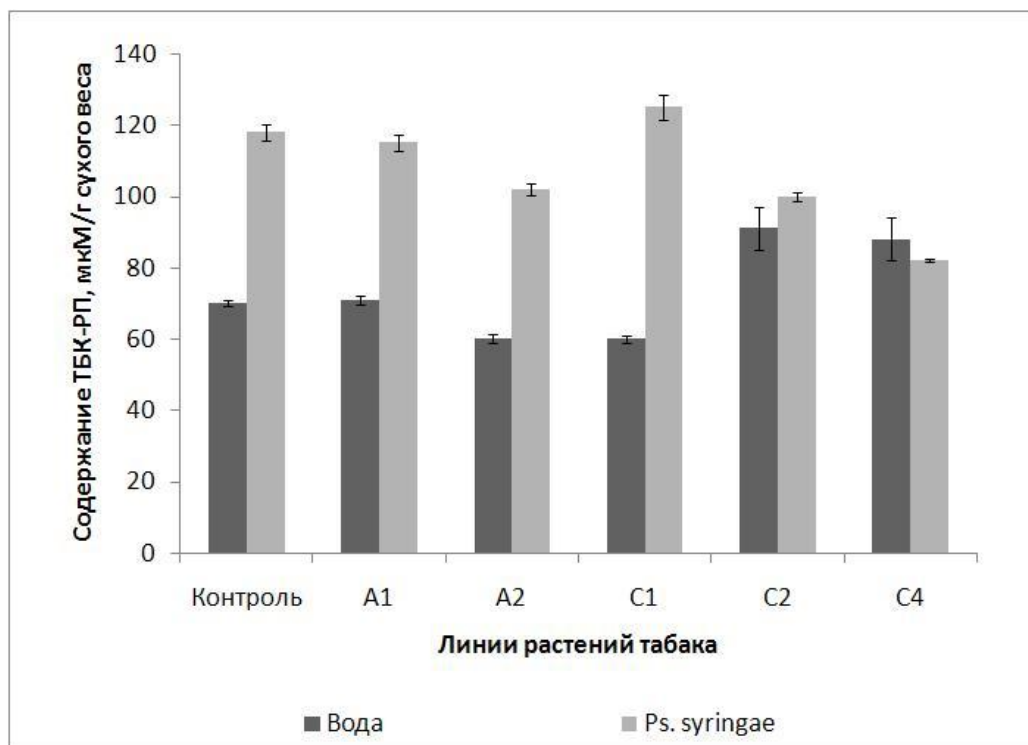


Рис. 8. Уровень ПОЛ при экспонировании растений табака на воде или при обработке фитопатогенном *Pseudomonas syringae*.

Под действием патогена *Ps. syringae* в контроле происходил незначительный рост уровня свободного пролина, при этом в смысловых линиях наблюдали его увеличение более, чем в 3 раза (рис. 9). Рядом исследователей показано, что растения с большим уровнем пролина обладают большей устойчивостью к стрессорам (Кузнецов, 1999). На растениях томата показано, что заражение листьев вирулентными штаммами *Ps. syringae* не вызывает изменения уровня пролина, тогда как авирулентные штаммы *Ps. syringae* приводят к накоплению эндогенного пролина. Таким образом, возрастание уровня пролина в трансгенных растениях со смысловой формой гена *hmg1* свидетельствует о повышении их устойчивости к биотическому стрессу.

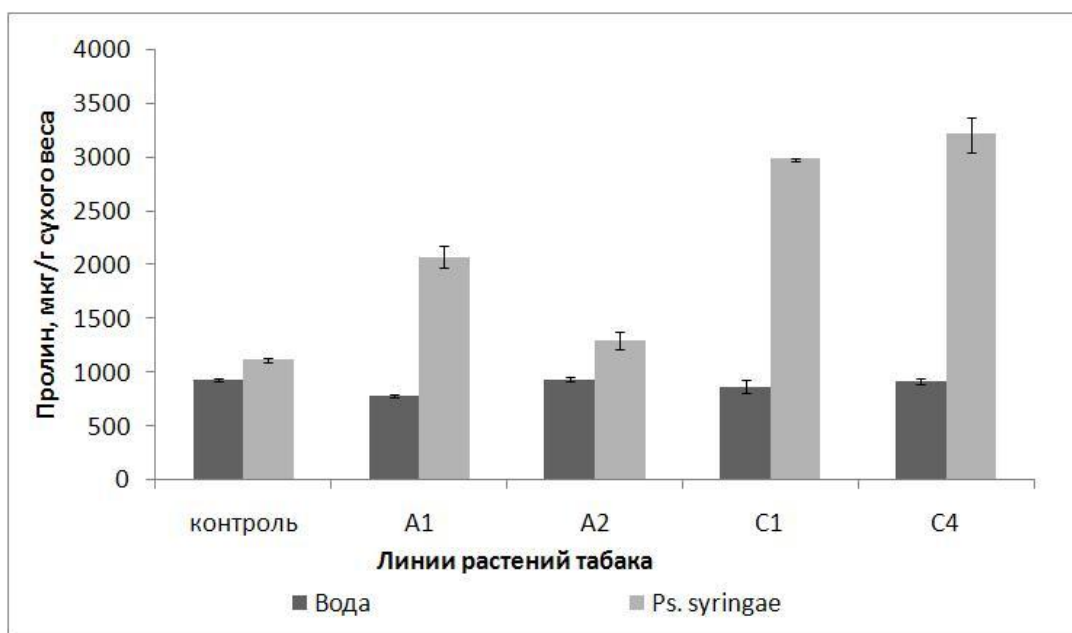


Рис. 9. Содержание свободного пролина в тканях контрольных и трансгенных растений табака в норме и при биотическом стрессе *Pseudomonas syringae*.

Для понимания механизмов устойчивости трансгенных растений с геном *hmg1* к этому фитопатогену провели оценку активности супероксиддисмутазы. Активность СОД у трансгенных растений при биотическом стрессе возрастала сильнее, чем в контроле, что свидетельствует о большей нейтрализации супероксида в трансгенных линиях табака.

Таким образом, изучение антиоксидантного статуса растений показало, что линия C1 была менее устойчива к биотическому стрессу, что может быть связано с низкой экспрессией трансгена в этой линии. Линия C1 значительно отличалась от других линий со смысловой конструкцией и по показателям мезоструктуры листа.

Как было показано выше, ткани листа трансгенных линий, независимо от встроенной генетической конструкции с геном *hmg1*, имеют более плотную упаковку мезофилла в объёме листа, что может как способствовать, так и препятствовать

распространению биотрофных фитопатогенов в растении, в зависимости от особенностей вторичного обмена. Однако смысловые и антисмысловые линии имеют разный уровень вторичных метаболитов. Проведя корреляционный анализ, мы выяснили, что устойчивость к фитопатогену у линий со смысловой копией гена имеет сильную обратную корреляцию с плотностью упаковки клеток в объеме листа ($r=-0,9$), тогда как для антисмысловых линий такой зависимости не показано ($r=-0,3$).

Таким образом, показана специфичность реакций растений с разными формами гена *hmg1* на биотический стресс и увеличение устойчивости трансгенных линий со смысловой копией гена к фитопатогену *Ps. syringae* с широким спектром хозяев.

Аналогичные результаты получены нами при заражении листовых дисков табака некротрофным фитопатогенном *Ervinia carotovora* (Ермошин 2010, 2011), рис.10.

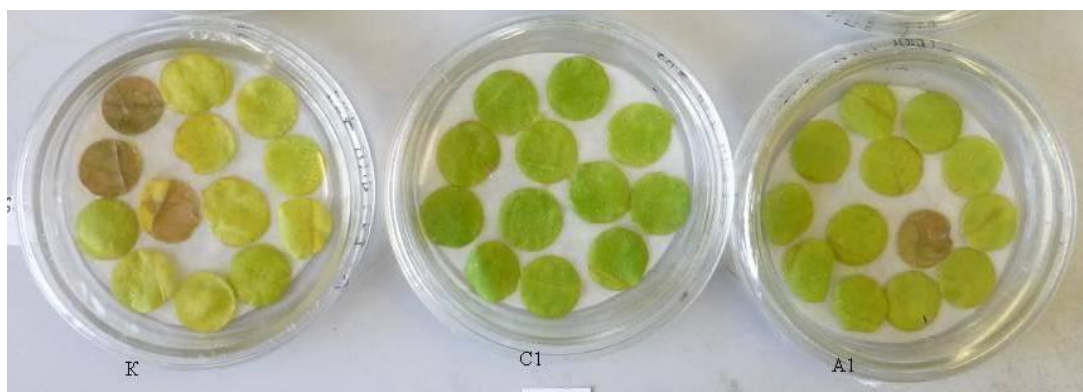


Рис.10. Заражение листовых дисков табака фитопатогенном *Ervinia carotovora* в течение 7 сут.

2.9.2 Реакция трансгенов табака на окислительный стресс, вызванный паракватом

Поскольку сесквитерпены могут выполнять роль не только фитоалексинов, но и антиоксидантов, представляло интерес выяснить реакцию трансгенных линий на окислительный стресс, вызванный паракватом.

Как и в случае с биотическим стрессом, растения с антисмысловой формой гена *hmg1* не показали снижения устойчивости к этому стрессу в сравнении с контролем. Растения со смысловой формой гена обнаружили большую устойчивость к абиотическому стрессу. Это подтверждается меньшей степенью перекисного окисления мембран клетки. Под действием гербицида в контроле и в антисмысловых линиях происходил рост содержания продуктов ПОЛ, тогда как в смысловых линиях под действием параквата степень ПОЛ оставалась прежней или даже снижалась (рис. 11).

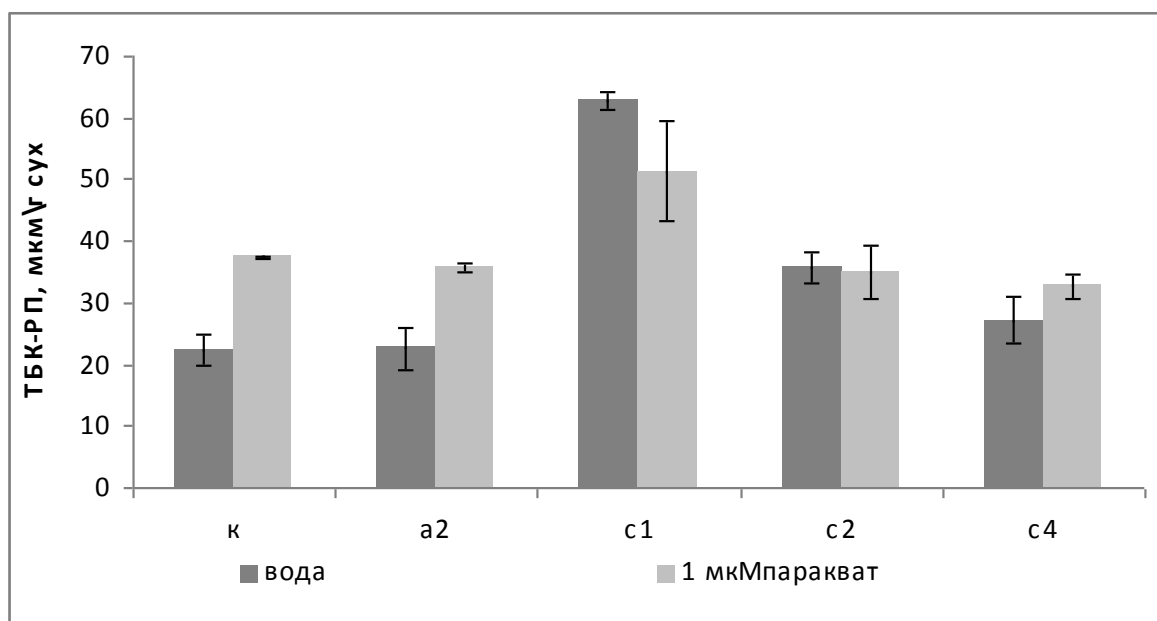


Рис. 11. Уровень ПОЛ в листьях контрольных и трансгенных растений табака с геном *hmg1* под действием параквата.

Содержание пролина существенно не изменялось под действием окислительного стресса, вызванного паракватом. При этом в контроле и в антисмысловой линии происходило ингибирование активности гваяколовой пероксидазы, что может свидетельствовать о высоком уровне стресса, с которым растение не справляется, тогда, как в смысловых линиях активность фермента сохранялась, что говорит об эффективной утилизации АФК (рис. 12).

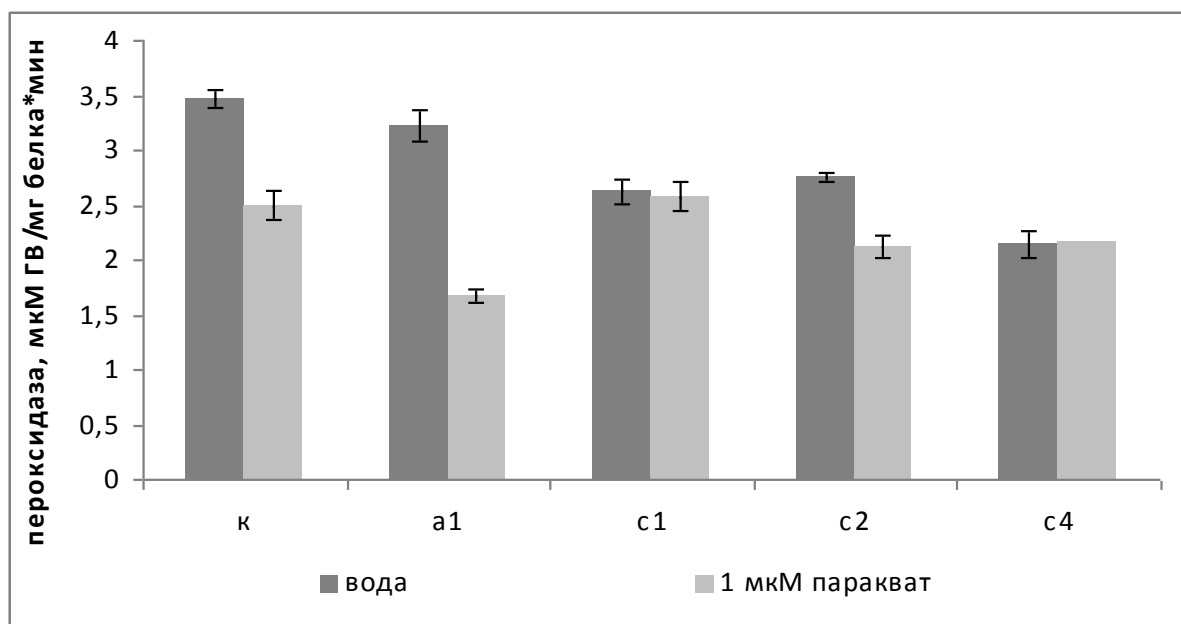


Рис. 12. Активность пероксидазы в листьях растений табака в ответ на действие параквата.

2.10 Влияние гена *hmg1* на репродуктивную сферу растений

Ранее сообщалось, что линии с антисмысловой копией гена *hmg1* имеют белую окраску венчиков цветков (Поройко, 2000), тогда как контрольный табак имеет цветки тёмно-розового цвета. Исследованные нами трансгенные линии имели розовую окраску венчиков, при этом визуально казалось, что растения со смысловой копией гена имели более светлую окраску, чем в контроле. Для количественной оценки нашего наблюдения мы провели экстракцию и спектрофотометрическое определение количества антоцианов. Все линии, кроме трансформированных пустым вектором, имели несколько сниженный уровень антоцианов. Однако для растений, несущих смысловую копию гена *hmg1*, данное снижение было незначительно, недостоверно отличалось от контроля и составляло 12-20%. Растения с антисмысловой копией гена содержали значительно меньше антоцианов, снижение относительно контроля достигало 67% (рис. 13).

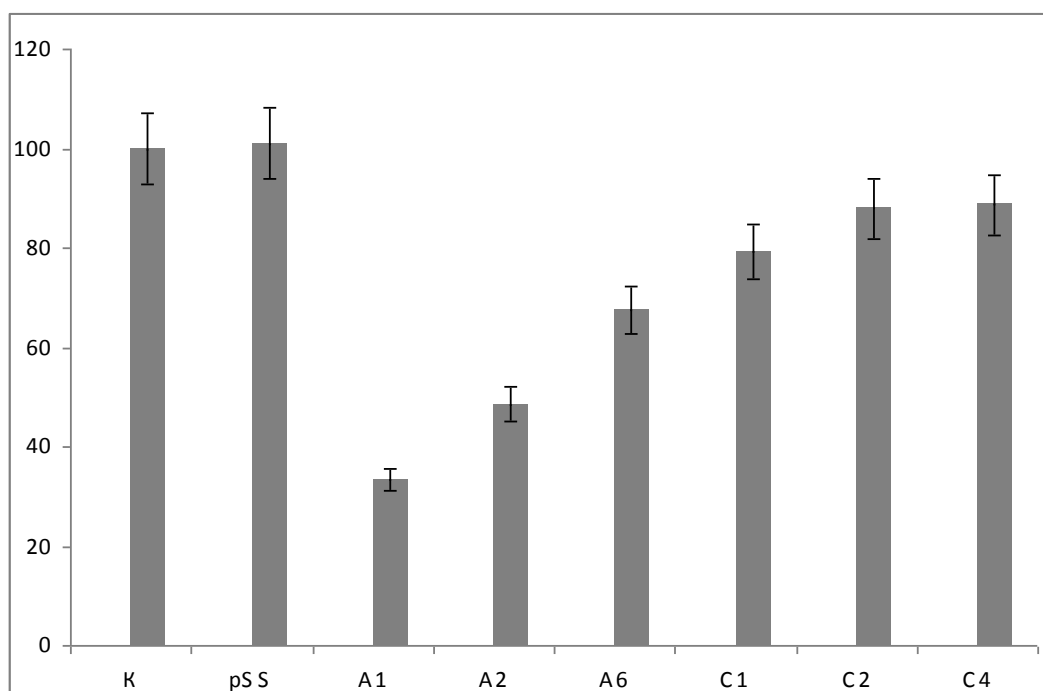


Рис. 13. Содержание антоцианов в тканях венчиков цветков табака (%). Содержание антоцианов в контрольных растениях принято за 100%.

Такое снижение содержания антоцианов в лепестках трансгенных растений может быть объяснено снижением активности халконсинтазы и халкооксидазы, ответственных за образование антоцианов. Активность этих ферментов зависит от уровня эндогенных гиббереллинов (Лутова, 2000). Гиббереллины являются терпеноидными соединениями, но начальные этапы их биосинтеза локализованы в хлоропласте. Наблюдаемое изменение

может являться дополнительным доказательством достаточно сильного обмена интермедиатами между компартментами и разными метаболическими путями биосинтеза изопреноидов. В ранних работах предполагалось, что поток изопентенилпирофосфата идёт только из хлоропласта в цитозоль, а не обратно. До настоящего времени ряд исследователей сомневаются в двухсторонней направленности потока предшественников (Зитте и др., 2008).

У трансгенных и контрольных растений табака были получены плоды и семена. Известно, что растения арабидопсиса, мутантные по гену *hmg1* или по синтезу брассиностероидов или цитокининов имеют сниженную всхожесть семян (Suzuki et al., 2004). Это явилось причиной нашего интереса к всхожести полученных нами семян. В работе использовали семена разных лет – 2003 года, 2009 года, два урожая 2010 года. Во всех случаях получили одинаковый результат - семена контрольных растений и семена растений со смысловой копией гена не отличались по всхожести. Это может быть связано с тем, что метаболизм фитогормонов регулируется на разных уровнях, и в полученных нами семенах избыточного содержания фитогормонов не было.

Семена антисмысловых линий имели несколько меньшую всхожесть семян в сравнении с контролем (до 24%), и данное отличие было достоверно (табл. 2).

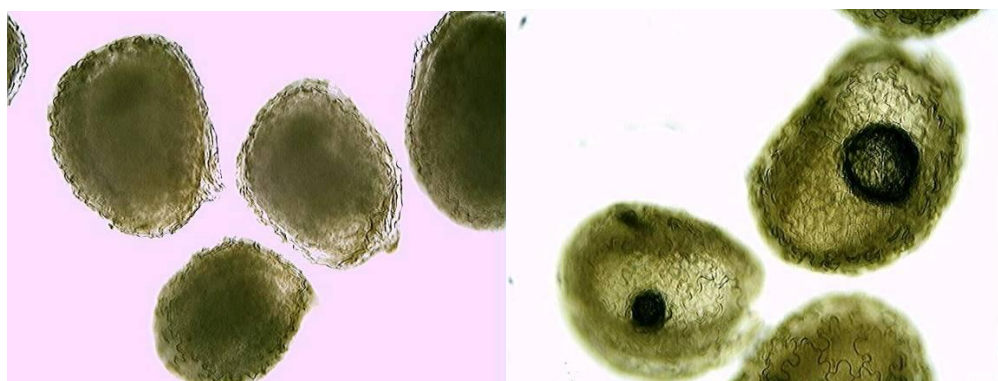
Табл. 2. Всхожесть семян (%) контрольных и трансгенных растений табака с геном *hmg1*

Линия	Время сбора семян				сред нее
	20 03 г	июл ь 2009	феврал ь 2010	сентябр ь 2010	
контроль	92	80	84	94	88
A1	-	50	78	64	64
A2	82	-	76	82	80
A6	76	-	-	-	76
C1	-	84	90	-	87
C2	72	-	94	84	82
C4	86	-	80	80	82

Как было указано выше, данный факт не может быть объяснен снижением уровня или изменением спектра стероидов в семенах.

Для выяснения причин уменьшения всхожести семян у трансгенных форм мы провели микроскопические исследования просветленных щелочью семян. Показано, что значительная часть семян антисмысловых линий не выполнена, имеет прозрачное светло

коричневое содержимое, в то время как семена других линий и контроля имеют непрозрачное тёмное, почти чёрное содержимое (рис. 14).



Контроль

Линия A1

Рис. 14. Семена контрольных растений и растений с антисмысловой копией гена *hmg1* после просветления семенной оболочки щелочью.

Проведено проращивание семян на агаризованной среде МС. Для отбора проростков трансгенных линий в среду добавляли 100 мг/л сульфата канамицина. Получено множество канамицин-резистентных всходов. ПЦР-анализ ДНК, выделенной из части таких устойчивых проростков, выявил наличие в них вставки как целевого (*hmg1*), так и маркерного (*nptII*) генов. Таким образом, показано наследование всей генетической конструкции в первом семенном поколении во всех исследованных линиях трансгенных растений табака (рис. 15).



A6 A2 K A1 C4 C2 C4 M

Рис. 15. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК канамицин-резистентных проростков поколения T1c праймерами к целевому гену *hmg1*.

С целью дальнейшего анализа семенной продуктивности растений табака определяли вес семенных коробочек. Плоды растений антисмысловых линий имели меньший вес, что может быть результатом как меньшего веса невсхожих семян, так и меньшего количества семян в плодах.

Для определения причин снижения всхожести и количества семян растений с антисмысловой копией гена была исследована женская и мужская генеративная сфера растений.

Сообщалось, что растения с нарушениями в ацетатно-мевалонатном метаболическом пути или со сниженным уровнем брассиностероидов имеют повышенный уровень стерильности пыльцы. Мы оценили показатели фертильности пыльцы в исследуемых линиях табака различными методами. Результаты всех использованных методов выявили одинаковую тенденцию - пыльца растений со смысловой копией гена *hmg1* не отличалась по уровню фертильности от контроля, в то время как пыльца антисмысловых растений имела значительно меньшую фертильность (рис. 16,17).

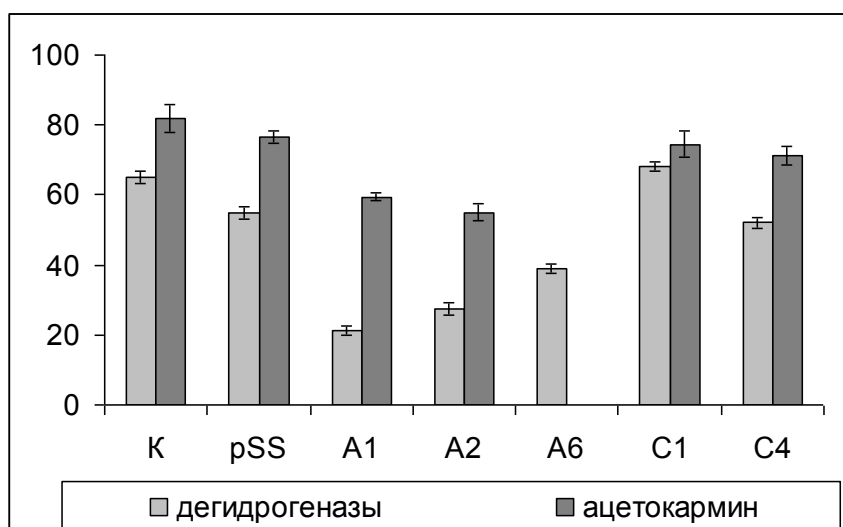


Рис. 16. Степень фертильности (% от общего числа) пыльцы трансгенных растений, определенная двумя методами (по активности дегидрогеназ и окрашиванием ацетокармином).

Отмечены некоторые отличия в степени фертильности пыльцы. В смысловых линиях и в контроле процент фертильных пыльцевых зерен, определенный разными методами, не сильно отличался, тогда как для антисмысловых линий отличия были значительны. Наибольшее количество фертильных пыльцевых зёрен у этих линий мы наблюдали при окраске ацетокармином. Данная методика выявляет наличие нуклеиновых кислот в клетках. При определении активности дыхательных ферментов - дегидрогеназ, выяснилось, что фертильность антисмысловой пыльцы значительно меньше, чем при использовании ацетокарминовой методики. Это может говорить о том, что стерилизация пыльцы происходит на поздних этапах развития мужского гаметофита, в то время как у инсерционных мутантов табака и у растений, подвергающихся действию различных неблагоприятных факторов, обычно стерилизация наступает на ранних стадиях и

окрашивания ацетокармином не происходит.

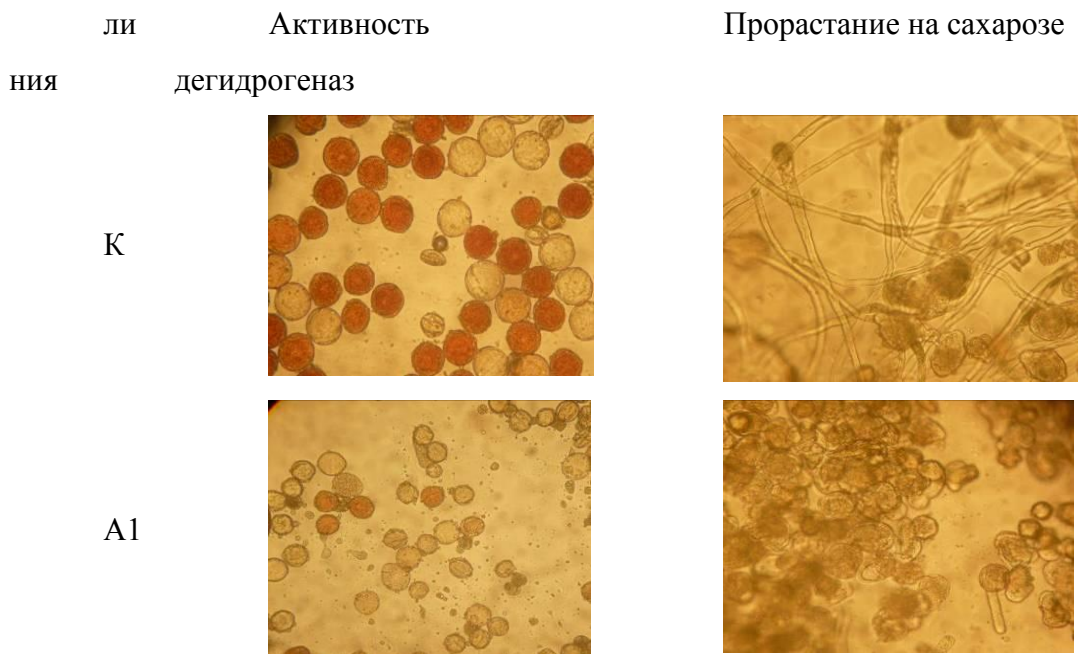


Рис. 17. Оценка жизнеспособности пыльцы линии A1 и контроля по активности дегидрогеназ (фертильные зёрна – ярко-красные, стерильные – не окрашены) и по прорастанию на 5% сахарозе.

Жизнеспособность пыльцы, кроме того, оценивали проращиванием её на агаризованном растворе сахарозы. В этом случае прорастали только единичные пыльцевые зёрна антисмысловых растений, причём скорость роста пыльцевой трубки у них была в несколько раз снижена. Данное наблюдение подтверждает нашу гипотезу о поздней стерилизации пыльцы у растений с подавленным синтезом мевалоната (антисмысловые формы).

В работе сотрудников ИФР РАН, исследовавших стерильный инсерционный мутант табака, было показано, что отсутствие активности дегидрогеназ положительно коррелирует с отсутствием активности гваяколовой пероксидазы (Баврина, 2007; Миляева, 2002). При исследовании наших трансгенных линий табака мы показали, что практически вся пыльца содержит активную гваяколовую пероксидазу и каталазу, при этом дыхательные дегидрогеназы в ней неактивны. Возможным объяснением может быть то, что растения с антисмысловой копией гена имеют дефектную электрон-транспортную цепь, т.к. образование полипrenoльного остатка убихинона происходит при участии мевалоновой кислоты. Возможно, наблюдаемые явления могут быть связаны с изменением уровня фитогормонов в пыльце у трансгенных форм, и это требует дальнейшего исследования.

Данные об изменениях в мужской генеративной сфере растений с изменённым

метаболизм изопреноидов в литературе имеются (Suzuki, et al., 2009), тогда как сведений о подобных изменениях в женском гаметофите нами в литературе не обнаружено. При этом в трансгенных растениях с геном *gus* под контролем промотора гена *hmg* показано, что ген *hmg* экспрессируется не только в проростках семян и пыльцевой трубке, но и в зародышевых мешках, рыльце и столбике пестика (Enjuto, 1995).

Нами изучена морфология семян табака. Все трансгенные линии имели увеличенную частоту патологии в семяпочках, что проявлялось в изменении формы семяпочки, неправильной ориентации микропиле относительно фуникулуса, неполным разворотом семяпочки или его отсутствием, гипертрофией или недоразвитостью интегументов. При этом в смысловых линиях с геном *hmg1* данные патологии встречались значительно реже, чем в линиях с антисмысловой копией гена (рис. 18, 19).

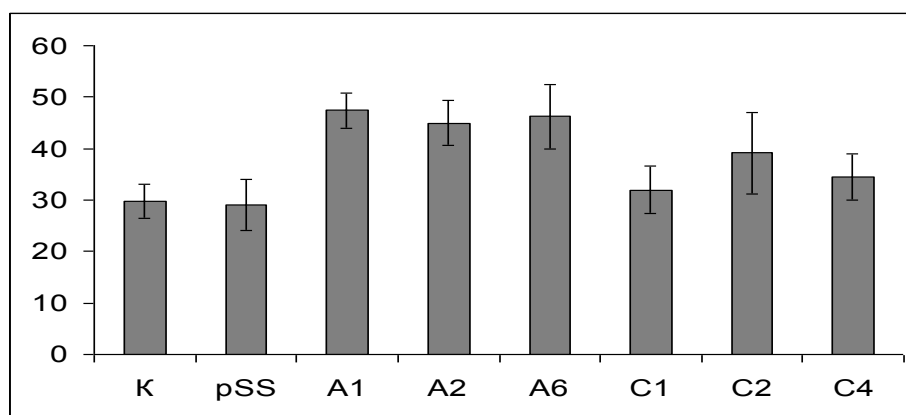
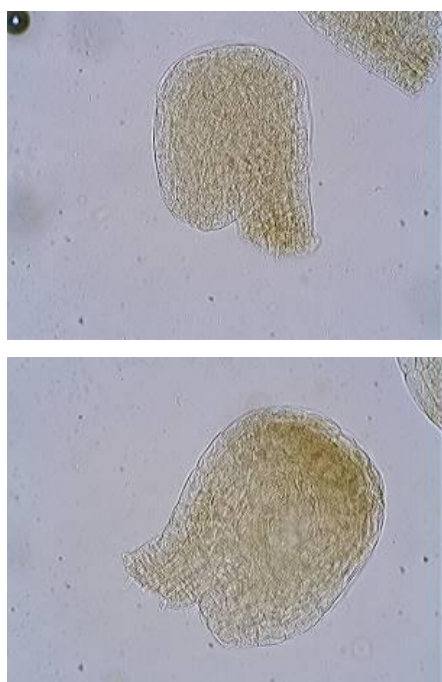
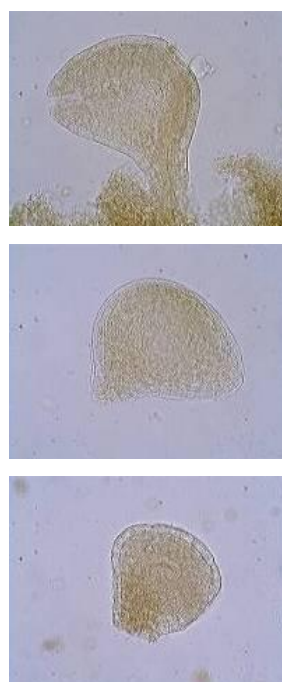


Рис. 18. Частота встречаемости аномальных семяпочек в завязи табака (% от общего числа).



А - нормальные



Б - абортивные

Рис. 19. Морфология семян табака

Таким образом, трансгенные растения, в которых с помощью технологии антисмысловых РНК был подавлен ацетатно-мевалонатный метаболический путь, имеют повышенный процент патологических семян, большой коэффициент стерильности пыльцы, что может являться причиной пониженной всхожести семян и их невыполненности.

2.11 Получение трансгенных растений картофеля и томатов с геном *hmg1*

Картофель в значительной мере поражается фитофторой и колорадским жуком, что приносит огромные потери сельскому хозяйству. Однако известно, что эти организмы не способны к самостоятельному синтезу стерина и должны получать их с пищей. Отсутствие в их рационе этих соединений замедляет рост патогенов и препятствует половому размножению. Поэтому перспективным является создание растений со сниженным содержанием стерина, как экологически безопасных устойчивых к вредителям форм.

Поражение картофеля фитофторозом происходит во второй половине вегетационного сезона, во время и после цветения, поэтому особенно важно снизить уровень стерина именно в это время. Проводя исследования на табаке (представитель того же семейства), мы показали, что особо сильное уменьшение количества стерина происходит именно во время цветения растений. Аналогичные результаты мы надеемся получить и на картофеле.

Для картофеля плоды не являются хозяйственно ценными частями растения. Наоборот, они конкурируют за ассимиляты с клубнями, поэтому снижение образования плодов и семян за счёт подавления биосинтеза изопреноидов может так же положительно сказаться на урожае.

Для получения трансгенных линий картофеля был применён метод агробактериальной трансформации эксплантов растений картофеля, выращенных *in vitro*. В качестве эксплантов использовали либо отрезки стеблей, либо фрагменты листьев. Во время трансформации и регенерации применяли две схемы добавления гормонов – с использованием 2,4-Д и без этого гормона. Известно, что 2,4-Д вызывает дедифференциацию клеток растений, поэтому его использование могло дать большой выход регенерантов, однако слишком долгое инкубирование с данным ауксином или слишком большая его концентрация могут вызвать появление неморфогенного каллуса и, наоборот, уменьшить регенерацию. Мы сравнили применение разных эксплантов, сочетаний гормонов и различных концентраций селективного антибиотика канамицина с

целью возможного их применения для получения трансгенных линий картофеля сорта Дезире.

Изначально мы применяли концентрацию сульфата канамицина равную 50 мг/л среды. Данная концентрация используется для регенерации трансгенного табака и поддержания его линий. Многие исследователи для разных видов, в том числе для картофеля, используют концентрации канамицина до 100 мг/л. Однако даже при дозе антибиотика 50 мг/л среды выявлено побурение и отмирание эксплантов, используемых при трансформации. Наблюдался незначительный выход регенерантов, они были единичными, слабыми, появлялись ближе к концу второго месяца после трансформации. При пересадке на среду с этой же дозой антибиотика регенеранты не образовывали корней и гибли. В связи с этим было проведено изучение возможности применения нескольких других концентраций селективного агента. Была установлена оптимальная концентрация – 25 мг/л среды, которую мы далее использовали при селекции.

Метод трансформации №1.

Экспланты нарезали, переносили на чашку со средой МС, содержащей 2.5 мг/л тиамина, 12.5 мг/л пиридоксина, 12.5 мг/л никотиновой кислоты, 0.5 мг/л фолиевой кислоты, 0.05 мг/л биотина, 50 мг/л глицина, 2 мг/л рибозида зеатина, 0.2 мг/л НУК. После двух суток инкубации экспланты инкубировали 30 мин в разбавленной в 10 раз ночной культуре агробактерий с добавлением 200мкМ ацетосиренгона и 2% глюкозы. Диски высушивали на фильтровальной бумаге и переносили на среду того же состава без антибиотиков, но с добавлением 0.02 мг/мл ГА₃. Через 2 суток экспланты переносили на ту же среду, содержащую 500 мг/мл антибиотика цефотаксима для элиминации агробактерий, а ещё через неделю – на среду с цефотаксимом и 25 мг/л сульфата канамицина, для селекции трансформантов.

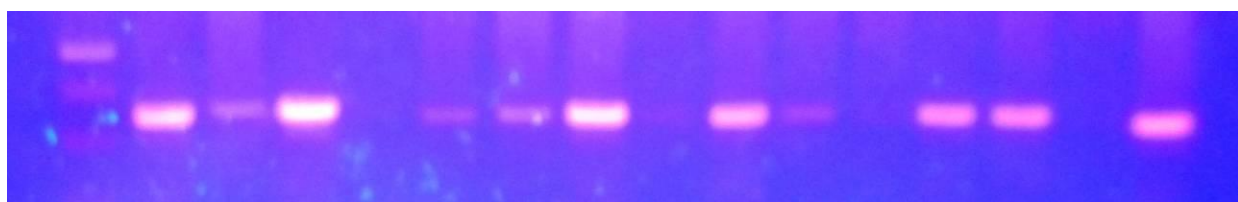
Метод трансформации №2.

Среда – МС с 3% сахарозы и витаминами, как описано выше. Прединкубацию проводили на среде с 0.8 мг/л рибозида зеатина и 1 мг/л 2,4-Д. Трансформацию выполняли в суспензии агробактерий со сниженной до 100 мкМ концентрацией ацетосирингона, что по литературным данным уменьшает некроз тканей. Регенерацию проводили на среде с 1 мг/л рибозида зеатина, 0.2 мг/л НУК и 0.2 мг/л ГА₃. Антибиотики использовались как в предыдущем методе, добавляли со 2 пассажа, на 7-10 день после трансформации.

Использование метода №2 позволяет существенно экономить дорогостоящий рибозид зеатина. Применение данной методики позволило существенно увеличить выход регенерантов и уменьшить время от трансформации до получения побегов. Однако данная

методика имела недостаток – сложность отбора линий, поскольку эффективность трансформации не превышала 10%, а количество регенерантов было слишком велико, чтобы их проверить.

В результате нашей работы было отобрано несколько линий, которые имели нормальный фенотип, не отличающийся от контроля. Они хорошо укоренялись и росли на среде, содержащий канамицин, не «зарастали» агробактериями при переносе их на среду, не содержащую цефотаксим (рис. 20). Линии со смысловой формой гена *hmg1* обозначены как SC (SC1-SC5), с антисмысловой - SA (SA1-SA11), трансформированные «пустым» вектором – трансгенный контроль (TK1-TK9).



М SA1 SC4 K+ вода TK9 TK8 TK7 K- K+ SA12 K- SA11SA10 K- K+

Рис. 20. Электрофорез продуктов ПЦР с праймерами к маркерному гену *nptII* ДНК регенерантов картофеля.

Томат является ценным сельскохозяйственным видом, однако он часто поражается фитофторой, что приводит к значительным потерям урожая. Актуальной задачей является создание линий, устойчивых к патогенам. С этой целью мы решили создать трансгенные формы с изменённой интенсивностью синтеза стероидов. В связи с тем, что фитофтора является ауксотрофом по синтезу стероидов, скорость её роста и размножения зависит от содержания этих веществ в тканях растения-хозяина.

Трансформацию и регенерацию трансгенных томатов проводили, используя семядольные листья и гипокотили 10-дневных асептических проростков томата коммерческих сортов.

Трансформацию проводили по следующему протоколу:

Экспланты прединкубировали на 3% среде МС с добавлением 1 мг/л зеатина и 0.1 мг/л ИУК. Затем экспланты трансформировали ночной культурой агробактерий, разбавленной в два раза, с добавлением 100 мкМ/л ацетосиренгона, 2% глюкозы и Silwet L-77 до 0.005%. Экспланты инкубировали двое суток на среде прежнего состава, по истечении этого времени – переносили на среду с добавлением 500 мг/л цефотаксима и 50 мг/л сульфата канамицина. Оценивали интенсивность регенерации разных сортов и

разных эксплантов (табл. 3).

Таблица 3. Регенерационная способность сортов томата

Сорт	Частота регенерации из семядольного листа, рег./эксп.	Частота регенерации из гипокотилия, рег./эксп.
Балконное чудо	0.29	0.08
Вспышка	0.38	0
Джина	0.50	0.29
Субарктик	1.15	0.46

Из данных, представленных в таблице видно, что наиболее подходящими для работы являются сорта Джина и Субарктик, при этом лучше использовать семядольные листья, чем гипокотили.

В результате нескольких экспериментов были получены канамицин-резистентные регенеранты, проверка трансгенной природы которых сейчас проводится.

Регенерация томата идёт интенсивно и быстро, однако полученные регенеранты очень плохо укореняются на среде и часто гибнут. По этой причине мы решили провести трансформацию методом *in planta*.

Трансформацию растений томата *in planta* проводили на цветках. Для этого ночную культуру агробактерий разбавляли жидкой средой МС в 2-4 раза и добавляли в нее ацетосиренгон до 100 мкМ/л с целью индукции *vir*-области плазмиды и Silwet L-77 до 0.005%, чтобы улучшить адсорбцию бактерий на клеточной стенке растений.

В работе использовали растения сорта Субарктик, Балконное чудо и Вспышка, выращенные на станции искусственного климата «Биотрон». Процедура трансформации заключалась в том, что соцветия цветков опускали в суспензию индуцированных агробактерий, после чего закрывали изолятором для создания влажности на 7 дней. Все образующиеся нетрансформированные соцветия в процессе роста удаляли.

После данной процедуры были получены плоды. Содержание семян в них было меньше, чем в контрольных плодах. Из плодов извлечены семена, пророщены, отобраны канамицин-резистентные проростки. В настоящее время проводится определение их трансгенной природы.

Чтобы отобрать канамицин-резистентные семена и облегчить процедуру отбора трансгенных растений, необходимо было определить чувствительность семян томата к селективному агенту, поскольку проростки томата обладают достаточно высокой

устойчивостью к канамицину. Проращивание семян проводили при концентрациях канамицина в среде от 50 до 200 мг/л. При этом оценивали такие показатели, как всхожесть, длина главного корня, наличие боковых корней, изменение пигментации растений. Результаты представлены в таблице 4.

Как видно из данных таблицы, проростки томатов выживали даже после 8 недель пребывания на селективной среде. Всхожесть семян на канамицине не уменьшалась. Характерного для канамицина разрушающего действия на хлорофилл в виде появления белых пятен не наблюдалось. Однако образование боковых корней наблюдалось только в контрольном варианте без канамицина. Известно, что канамицин подавляет образование

Таблица 4. Длина главного корня проростков томата (сорт «Балконное чудо») на средах с сульфатом канамицина в возрасте 8 недель.

Концентрация сульфата канамицина, мг/л	0 (контр.)	50	100	150	200
Средняя длина корня, мм	75 ±2.5	28 ±2.0	20 ±2.0	18 ±2.0	15 ±1.5
Наличие боковых корней	+	-	-	-	-
Наличие фиолетовых пятен на растении	-	-	+	+	+
Наличие белых пятен на проростках	-	-	-	-	-

боковых корней в растениях и рост главного корня. Кроме того, фиолетовые пятна на проростках могут свидетельствовать о накоплении антоцианов, как защитной реакции на действие антибиотика. Исходя из этих данных, наиболее удачной концентрацией канамицина для селекции является концентрация 100 мг/л. При этом для проверки трансгенной природы нужно использовать проростки, у которых имеются боковые корни, длина главного корня превышает 3 см, нет фиолетовых пятен на семядолях и гипокотиле, и развивается первый лист.

2.12 Заключение и выводы по III этапу НИР

С помощью манипулирования уровнем мевалоновой кислоты, можно создавать трансгенные растения с полезными для человека свойствами. Повышая уровень

мевалоната можно получить растения, устойчивые к неблагоприятным факторам внешней среды, при этом, не меняя их продуктивности и фертильности. Ослабляя интенсивность синтеза мевалоната, можно получить экологически более безопасные трансгенные растения со сниженной фертильностью.

Были получены трансгенные растения табака, картофеля и томатов, экспрессирующие гетерологичный ген *hmg1* в прямой и обратной ориентации относительно промотора. Для 6 линий трансгенных растений табака было проведено изучение влияния экспрессии данного гена на организацию фотосинтетического аппарата растений, их устойчивость к стрессорам различной природы, состояние репродуктивной сферы. Данные по влиянию экспрессии *hmg1* гена на состояние женской репродуктивной сферы нами в литературе не обнаружены. В связи с этим наши данные по особенностям женской генеративной сферы у трансгенного табака могут считаться приоритетными.

Материалы исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Экспрессия гетерологичного гена *hmg1* влияет на организацию фототрофных тканей листа табака: упаковка клеток мезофилла в листе всех трансгенных линий более плотная, чем у контрольных растений. У смысловых растений большая плотность мезофилла достигается за счёт увеличения объёма клеток губчатой ткани, у антисмысловых – за счёт роста числа клеток и уменьшения толщины листа.

2. Растения табака со смысловой копией гена *hmg1* обладают большей устойчивостью к действию стрессов биотической (фитопатогены) и абиотической (гербицид паракват) природы, чем контрольные растения, что подтверждается более низким уровнем ПОЛ и увеличением содержания свободного пролина. Антисмысловые линии по устойчивости к патогенам не отличаются от контроля, что может быть связано со слабым ингибированием экспрессии гена *hmg1* при использовании стратегии антисмысловых РНК.

3. Трансгенные растения не отличались от контрольных по качественному составу стерина, но отличались по их количеству. Листья смысловых линий до цветения содержали в 1,5 раза больше стерина, чем контрольные и антисмысловые, а семена – на 50%. Во время цветения количество стерина в листьях смысловых и контрольных растений не отличалось, а у антисмысловых снижалось на 20%. В корнях содержание стерина не отличалось у всех форм.

4. Трансгенные антисмысловые растения в сравнении с другими имели особенности в организации генеративной сферы. Всхожесть семян у них снижалась на 24%, невсхожие семена были невыполненными, аномалии в морфологии семяпочек встречались в 1.5 раза чаще, фертильность пыльцы была меньше.

5. Проведена трансформация растений картофеля конструкцией, содержащей гетерологичный ген *hmg1* из *A.thaliana*, отобраны линии трансгенного картофеля для последующей работы.

6. Разработана система трансформации цветков томата *in planta*. Выполнена трансформация растений конструкциями, содержащими ген *hmg1* в различных ориентациях по отношению к промотору, подобраны условия селекции проростков, отобраны канамицин-резистентные растения, ведётся оценка их трансгенной природы.

3 Отчет по обобщению и оценке результатов исследований по проблеме «Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений»

Проблема адаптации живых организмов к разнообразным условиям среды, в том числе стрессовым – одна из традиционных, но, вместе с тем, актуальных для современной биологии. Путям и механизмам адаптации организмов к стрессовым воздействиям посвящено огромное количество статей, книг, других публикаций. Значительная часть этих работ посвящена вопросам устойчивости растительных организмов. Это вполне понятно, поскольку растения – источник пищи, лекарственных веществ, древесины, волокон и других материалов для человека. Растения выполняют климатообразующую и средообразующую функции. Они создают среду обитания не только для людей, но и для всех других организмов в биосфере, являются продукционным звеном экосистем, трансформируют солнечную энергию в энергию химических связей, пригодную для использования всеми компонентами биоты, продуцируют кислород, обеспечивая тем самым, дыхание и горение, формирование озонового экрана, поддержание газового состава биосферы.

Последние 200 лет человечество активно производит товары, продукты, энергию для удовлетворения собственных потребностей. Развитие производства сопряжено с выбросом в окружающую среду огромного количества отходов, загрязняющих природные экосистемы. Загрязняющие вещества поступают во все среды жизни – наземную, водную, воздушную. Как правило, концентрация этих поллютантов в среде существенно выше естественного фонового уровня и является стрессовой для организмов. Живые организмы вынуждены приспосабливаться к новым условиям, в противном случае они обречены на вымирание.

Общие представления о механизмах приспособления растений к стрессовым условиям подробно рассмотрены нами в Отчете о проведении I этапа НИР. В нем обсуждены материалы 164 публикаций (статей, монографий, материалов конференций и симпозиумов) Российских и зарубежных исследователей. Особое внимание уделено представлениям об изменении фотосинтетического аппарата растений при стрессе.

Лист, будучи специализированным органом фотосинтеза, наряду с корневой системой растений, испытывает наиболее сильное воздействие, поскольку имеет большую поверхность, которая контактирует со стрессорами. Особо это касается техногенных поллютантов. При стрессе у любых живых организмов в клетках развивается окислительный взрыв, вызванный генерацией активных форм кислорода. Эти формы

исключительно агрессивны в отношении всего клеточного содержимого. Поэтому в клетках живых организмов в ходе эволюционного процесса формируются антиоксидантные системы. Их подробная характеристика, базирующаяся на анализе 98 публикаций разного уровня и ранга дана в Отчете о проведении II этапа НИР.

3.1 Модели и методология проведения научных исследований по проблеме «Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений»

Известно, что исследование тонких процессов, характеризующихся высоким уровнем сложности, требует использования модельных систем. В качестве моделей нами были выбраны: растения из природных популяций и их семенное потомство, выращиваемое в нормальных и стрессовых условиях; растения разных биолого-экологических групп (наземные и гидрофиты, накопители поллютантов и исключители; наконец, трансгенные растения с измененным биосинтезом изопреноидов, которые, как показано в Отчете по III этапу НИР (проанализировано 67 публикаций), принимают участие в формировании защитных реакций у растений при стрессе.

Таким образом, за время выполнения НИР коллективом исследователей проведена большая по объему, основательная работа по анализу имеющейся в литературе информации о механизмах приспособительных реакций растений, обеспечивающих их устойчивость, в том числе, специфическую и неспецифическую.

Анализ результатов выполненного исследования показал, что в условиях стресса меняется вся совокупность элементов фотосинтетического аппарата: лист как орган фотосинтеза, его морфометрические параметры, пигментные системы, интенсивность фотосинтеза, число и размеры клеток и хлоропластов, то есть структура мезофилла, генерация активных форм кислорода, степень повреждения ими мембран клеток, накопление низкомолекулярных антиоксидантов, активация ферментов окислительного стресса, изменение содержания различных в функциональном отношении изопреноидов, и т.д. Это означает, что фотосинтетический аппарат растений на разных уровнях своей организации от молекулярного до органного вовлечен в формирование устойчивости растений к стрессорам разной природы.

Важно отметить, что наше исследование было спланировано и исполнено таким образом, чтобы выявить неспецифические механизмы приспособления у растений, связанные с фотосинтетическими структурами. Для этого мы использовали широкий круг объектов – 9 видов дикорастущих наземных растений, 1 вид культивируемого табака,

включая трансгенные формы, 11 видов высших водных растений:

Список исследованных видов:

Высшие наземные растения:

Скерда кровельная

(*Crepis tectorum* L.)

Горицвет

(*Coronaria flox-cusculi* L.)

Полевица тонкая

(*Agrostis tenuis* Sibth.)

Кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis* L.).

Подорожник большой

(*Plantago major* L.)

Донник белый

(*Melilotus albus* Medik)

Клевер средний

(*Trifolium medium* L.)

Мать-и-мачеха

(*Tussilago farfara* L.).

Одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* L.)

Высшие водные растения

Элодея канадская

(*Elodea canadensis* Michx.)

Ряска трехраздельная

(*Lemna trisulca* L.)

Роголистник темно-зеленый

(*Ceratophyllum demersum* L.)

Рдест блестящий

(*Potamogeton lucens* L.)

Рдест альпийский

(*Potamogeton alpinus* Balb.)

Рдест пронзеннолистный

(*Potamogeton perfoliatus* L.)

Рдест курчавый

(*Potamogeton crispus* Balb.)

Шелковник

(*Batrachium trichophyllum* Bosch.)

Водокрас лягушачий

(*Hydrocharis morsus-ranae* L.)

Ряска горбатая

(*Lemna gibba* L.)

Рдест плавающий

(*Potamogeton natans* L.)

Трансгенный табак *Nicotiana tabacum*, нормальные и трансгенные растения со встроенным гетерологичным геном *hmg1* в прямой и обратной ориентации, всего 8 линий.

Многообразие изученных видов позволило выявить общие закономерности приспособления растений к стрессовым условиям.

Другая принципиальная сторона исследования – использование растений из природных местообитаний и их семенного потомства. Такой подход позволил разделить акклимации и адаптации в формировании неспецифической устойчивости растений.

Еще один важный момент – использование стрессоров разной природы и напряженности действия: тяжелые металлы (медь, кадмий, никель, марганец и др.), органические поллютанты (фенолы), фториды, паракват, патогены для создания условий биотического стресса.

Такой комплексный подход позволил полно и максимально объективно установить роль структурно-функциональных приспособлений листа как органа фотосинтеза в обеспечении устойчивости растений при стрессе.

3.2 Рекомендации по использованию материалов исследования «Структурно-функциональные изменения фотосинтетического аппарата как один из путей повышения неспецифической устойчивости растений»

Результаты выполнения НИР могут быть применены при проведении дальнейших исследований, а также подготовке статей, монографий. Всего по итогам выполнения НИР членами исследовательского коллектива опубликовано 12 статей в высокорейтинговых Российских и зарубежных журналах. Материалы исследования апробированы на международных и Всероссийских конференциях. Защищена 1 кандидатская диссертация (Чукина Н.В. Структурно-функциональные показатели высших водных растений как основа адаптации к загрязнению водной среды). В декабре 2011 планируется защита еще 1 кандидатской диссертации.

Применение комплексного подхода (физиологические, биохимические,

анатомические исследования) к решению проблемы устойчивости растений позволит разработать методологию использования растений в ряде направлений технологического форсайта в области биотехнологии, инновационного сельского хозяйства, сохранения биоразнообразия растений, фиторемедиации.

В дальнейшем материалы исследования будут использованы для разработки и проведения скрининговых исследований по выявлению растений с высокой устойчивостью к техногенным поллютантам в целях фиторемедиации, фиторекультивации и других технологий, сберегающих и восстанавливающих окружающую среду; тест-системы для поиска растений, уникальных по свойству устойчивости. В будущем их можно будет использовать как источники ценных генов, обеспечивающих устойчивость культурных растений к техногенной среде.

Материалы исследований включены в учебно-методические материалы для студентов, обучающихся на направлениях «биология», «экология и природопользование», специальности «биотехнология» (Дисциплины: Физиология растений, Биохимия вторичного обмена, Устойчивость растений, Экологическая физиология растений, Фитопатология, Физиология стресса, Биотехнология растений и др.) и могут быть рекомендованы для подготовки студентов по направлениям и специальностям биологического, биотехнологического, экологического профилей.

4. Публикации результатов НИР

Заключение

Растения выполняют в биосфере исключительно важные функции: продукционную, энергетическую, продукции кислорода, средообразующую, климатообразующую, формирующую и поддерживающую атмосферу, трофическую и другие. От их функционального состояния фактически зависит вся биота Земли. В стремительно меняющихся современных условиях растения должны адаптироваться в новым факторам, прежде всего, техногенного происхождения. Эволюционно они к ним не приспособлены, но процесс адаптации, несомненно, идет. Поэтому важно понимать механизмы устойчивости растений, что бы использовать в практике приемы, повышающие их устойчивость. Кроме того, растения с хорошим адаптивным потенциалом можно использовать как источник полезных генов для селекционного процесса, проводимого как традиционными способами, так и инновационными генноинженерными.

Наши исследования показали, что в условиях хронического загрязнения окружающей среды у ряда наземных видов травянистых растений разной систематической и биоморфологической принадлежности и у ряда гидрофитов в градиенте нагрузки происходят существенные изменения на разных уровнях организации – клеточном, тканевом, целого листа, организменном. Данные изменения можно рассматривать как защитно-приспособительные реакции. Выявлен ряд закономерностей, характеризующих взаимосвязь компонентов антиоксидантных систем растений с их устойчивостью. Эти реакции растений на стресс представляют собой общие неспецифические механизмы защиты растений. Изучение антиоксидантных систем у растений из природных биотопов, различающихся по степени загрязнения, и у их семенного потомства позволяет различить акклимации и адаптивные изменения у растений при развитии окислительного стресса при воздействии техногенными факторами.

Анализ результатов исследования позволил сделать следующие выводы:

- В условиях стресса изменения структуры фототрофных тканей листа несколько различны для разных видов растений и типов загрязнения. У растений из природных местообитаний и их семенного потомства, произраставших в условиях сильного техногенного загрязнения, существуют некоторых компенсаторные механизмы, связанные с изменением внешней и внутренней ассимилирующей поверхности, что позволяет им успешно фотосинтезировать и выживать в импактной зоне.
- Тенденции в изменении пигментных систем наземных и водных растений,

представленных хлорофиллами и каротиноидами в растениях из природных популяций, отличающихся типом и степенью загрязнения их местообитания и семенного потомства этих растений, выращенного в условиях одинакового экофона без признаков загрязнения, одинаковы.

- Особенности фотосинтетического аппарата растений могут быть наследственно закреплены, так как проявляются у семенного потомства, выращенного в условиях одинакового экофона в отсутствии изучаемых поллютантов. То есть, изменения, произошедшие в фотосинтетическом аппарате растений, являются адаптациями (отобраны в ряду поколений), а не акклимацией, которая может быть устранена при удалении стрессора.
- У растений, происходящих из местообитаний с высоким уровнем техногенного воздействия, проявляется большая устойчивость к поллютантам разной природы, что проявляется в более низком уровне перекисного окисления липидов, по сравнению с растениями из незагрязненных или мало загрязненных местообитаний.
- В импактных зонах растения обладают более высокой активностью антиоксидантных ферментов: СОД и/или каталазы и пероксидазы. Аналогичные отличия отмечены для семенного потомства ряда наземных растений (горицвет, подорожник)
- Как водные, так и наземные растения при стрессе, вызванном разными поллютантами, способны накапливать большее количество SH-соединений и низкомолекулярных антиоксидантов, таких как, аскорбат, глутатион, пролин.
- Трансгенные растения табака с измененным метаболизмом изопреноидов обнаружили отличия по устойчивости и механизмам устойчивости в сравнении с контролем. Показано, что растения со смысловой копией гена *hmg1* обладают большей устойчивостью к действию стрессов биотической (фитопатогены) и абиотической (гербицид паракват) природы, чем контрольные растения, что подтверждается более низким уровнем ПОЛ и увеличением содержания свободного пролина. Антисмысловые линии по устойчивости к патогенам не отличаются от контроля, что может быть связано со слабым ингибированием экспрессии гена *hmg1* при использовании стратегии антисмысловых РНК.
- Устойчивость к патогену обусловлена, в том числе, изменением плотности фотосинтетических тканей листа, которая достигается разными путями у сенсовых и антисенсовых растений. .
- Трансгенные растения не отличались от контрольных по качественному составу стериннов, но отличались по их количеству. Листья смысловых линий до цветения

содержали в 1,5 раза больше стерина, чем контрольные и антисмысловые, а семена – на 50%. Во время цветения количество стерина в листьях смысловых и контрольных растений не отличалось, а у антисмысловых снижалось на 20%. В корнях содержание стерина не отличалось у всех форм.

- Трансгенные антисмысловые растения в сравнении с другими имели особенности в организации генеративной сферы. Всхожесть семян у них снижалась на 24%, невсхожие семена были невыполненными, аномалии в морфологии семян встречались в 1.5 раза чаще, фертильность пыльцы была меньше.
- Проведена трансформация растений картофеля конструкцией, содержащей гетерологичный ген *hmg1* из *A.thaliana*, отобраны линии трансгенного картофеля для последующей работы.
- Разработана система трансформации цветков томата *in planta*. Выполнена трансформация растений конструкциями, содержащими ген *hmg1* в различных ориентациях по отношению к промотору, подобраны условия селекции проростков, отобраны канамицин-резистентные растения, ведётся оценка их трансгенной природы.

Выполненные исследования во многом являются приоритетными. Научная новизна исследований состоит в следующем:

- Для понимания механизмов адаптации растений к техногенному загрязнению впервые был применен комплексный подход, состоящий в изучении процессов на организменном, тканевом, клеточном и биохимическом уровнях организации.
- Впервые использована методология исследования, состоящая в сочетании полевого и модельного лабораторного эксперимента; изучения растений в естественных условиях произрастания на разном расстоянии от источников эмиссий и их семенного потомства в условиях вегетационного и лабораторного опыта с использованием выровненного экофона.
- Впервые применен метод анализа мезоструктуры фотосинтетического аппарата к выявлению адаптаций растений к техногенному загрязнению у широкого круга объектов.
- Впервые использован комплексный методический подход, сочетающий в себе изучение анатомо-морфологических (мезоструктура фототрофных тканей) и физиолого-биохимических (рост, ассимиляция CO₂, содержание фотосинтетических пигментов, накопление тяжелых металлов, активность ферментов окислительного стресса, накопление антиоксидантов и др.) параметров,

что позволило определить широкий набор показателей, характеризующих адаптации растений на различных уровнях организации к условиям загрязнения.

- Впервые проведено сравнение изменений, возникающих в фотосинтетическом аппарате растений (пигментные системы и структура фототрофных тканей) у широкого круга объектов – дикорастущих видов наземных и высших водных растений при действии поллютантов. Показано, что у всех исследованных видов (включая растения из естественных местообитаний и их семенное потомство) имеются компенсаторные изменения мезофилла листа (структура фототрофных тканей, содержание пигментов), позволяющие ему нормально фотосинтезировать в условиях загрязнения кислыми газами, тяжелыми металлами, органическими поллютантами. Предполагается, что эти изменения генетически обусловлены и носят наследственный характер.
- Впервые изучение антиоксидантных систем у растений из природных биотопов, различающихся по степени загрязнения, и у их семенного потомства позволило различить акклимации и адаптивные изменения у растений при развитии окислительного стресса при воздействии техногенными факторами.
- Впервые выявлены физиолого-биохимические отличия по устойчивости к стрессу у трансгенных растений табака с геном *hmg1*.
- Экспрессия гетерологичного гена *hmg1* влияет на организацию фототрофных тканей листа табака: упаковка клеток мезофилла в листе всех трансгенных линий более плотная, чем у контрольных растений. У смысловых растений большая плотность мезофилла достигается за счёт увеличения объёма клеток губчатой ткани, у антисмысловых – за счёт роста числа клеток и уменьшения толщины листа.
-

Установленные в ходе исследования закономерности изменения структурно-функциональных признаков листьев растений под влиянием техногенных стрессовых факторов частично восполняет недостаток информации об изменении фотосинтетического аппарата растений как возможного пути формирования их неспецифической устойчивости. Изучение ответных реакций растений на токсическое действие токсичных веществ и механизмов адаптации, в том числе тех, которые наследуются, перспективно в направлении поиска генов, обеспечивающих общую и специфическую устойчивость растений к поллютантам и для прогноза последствий воздействия различных уровней загрязнения для биологических систем. Полученные сведения могут быть полезны для разработки методов диагностики устойчивости растений к поллютантам и осуществления

скрининговых исследований растений с целью обнаружения пригодных для целей фиторемедиации видов.

Материалы исследований содержат элементы новизны, проявляющиеся как в постановке задач, так и в получении оригинальных данных, например, по выявлению адаптаций и акклимаций у семенного потомства, Материалы исследования по уровню сопоставимы с лучшими Российскими, а по ряду моментов мировыми практиками.

Материалы исследований включены в учебно-методические материалы для студентов, обучающихся на направлениях «биология», «экология и природопользование», специальности «биотехнология».

В дальнейшем материалы исследования будут использованы для разработки и проведения скрининговых исследований по выявлению растений с высокой устойчивостью к техногенным поллютантам в целях фиторемедиации, фиторекультивации и других технологий, сберегающих и восстанавливающих окружающую среду; тест-системы для поиска растений, уникальных по свойству устойчивости. В будущем их можно будет использовать как источники ценных генов, обеспечивающих устойчивость культурных растений к техногенной среде.

Список используемых источников

1. Баврина Т.В., Миляева Э.Л., Гетман И.А., Романов Г.А. Особенности наследования TRP-фенотипа у инерционного мутанта табака с длительным периодом цветения // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 5. С. 730-737.
2. Ботаника. Том 2. Физиология растений. Под ред. Зитте П. и др. М.: «Академия», 2008.
3. Вайнтрауб Г.М. Антисмысловые РНК и ДНК // В мире науки. 1990. №3. С. 22-29.
4. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. В 2-х томах. М. Мир, 1986.
5. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Дьюри Г., Джекоб Л., Уолден Р., Кумар А., Джефферсон Р., Хэмил Дж. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. М.: Мир, 1991. 408 с.
6. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др Методы биохимического исследования растений /Л.:Агропромиздат. 1987. 430 с.
7. Ермошин А.А., Синенко О.С., Алексеева В.В., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И. Влияние экспрессии гена *hmgI* на физиолого-биохимические характеристики трансгенных растений. // Труды томского университета. Серия биологическая, 2010. Т. 275. С. 346 – 348.
8. Ершов Ю.В. Метилэритролфосфатный (немевалонатный) путь биосинтеза изопреноидов // Успехи биологической химии, т.45. 2005. С. 307 – 354.
9. Кандюк Р.П. Методы определения стероидов в морских объектах // Экология моря. 2002. Т. 59. С. 87-90.
10. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 2. С. 321-336.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
12. Лутова Л. А., Проворова Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений. Спб.: Наука, 2000. С. 292 – 302.
13. Лутова Л.А., Шумилина Г.М. Метаболиты растений и их роль в устойчивости к фитопатогенам // Экологическая генетика. Т. 1. № 10. 2003. С. 47-58.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

15. Миляева Э.Л., Гурко Н.А., Баврина Т.В. и др. Особенности развития мужской репродуктивной сферы инерционного мутанта табака с продолжительным периодом цветения. // Физиология астений. 2002ю Т. 49. № 4. С. 526-534.
16. Мокроносов А.Т., Борзенкова Р.А. Методика количественной оценки и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции ВНИИ растениеводства. 1978. Т. 61. С. 119.
17. Пасешниченко В.А. Биосинтез и биологическая активность растительных терпеноидов и стероидов. Итоги науки и техники. Биологическая химия. Т. 25. ВИНТИ, Москва, 1987.
18. Пасешниченко В.А. Терпеноиды и стероиды в жизни растений // Успехи биол. химии. 1991. Т. 32. С. 197-221.
19. Плотникова Л.Я. Иммуитет растений и селекция на устойчивость к болезням и вредителям / Под ред. Ю.Т. Дьякова. М.: КолосС, 2007. 359с
20. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие / Под ред. И.П. Ермакова. М.: КДУ, 2007. 140 с
21. Поройко В.А., Рукавцова Е.Б., Орлова И.В., Бурьянов Я.И. Фенотипические изменения трансгенных растений табака с антисмысловой формой гена *hmg1* // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1200–1205.
22. Bach T., Lichtenthaler H.K. Inhibition by mevinolin of mevalonate formation and plant root elongation //Naturwissen. 1982. V. 69. P. 242.
23. Bach T., Lichtenthaler H.K. Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation // Physiol. Plant. 1983. V. 59. P. 50-60.
24. Bach T. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis // Lipids. 1986.V. 21. P. 82-88.
25. Bach T. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants // Lipids. 1995. V. 30. P. 191-202.
26. Bach T., Motel A., Weber T. Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in plants // Rec. Adv. Phylochemistry. 1990. V. 24. P. 1-82.
27. Bach T., Lichtenthaler H. Mechanisms of inhibition by mevinolin of microsome-bound radish and of partially purified yeast HMG-CoA reductase (EC.1.1.1.34) // Z. Naturforsch. 1983. V. 38. P. 212-219.
28. Bates, L.S. Rapid determination of free proline content for waterstress studies // Plant Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–207.

29. Bevilacqua A., Erickson R.P., Hieber V. Antisense RNA inhibits endogenous expression in mouse preimplantation embryos: Lack of a double-stranded RNA "melting" activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 831-835.
30. Bird C.R., Ray J.A., Fletcher J.D. Boniwell J.M., Bird A.S., Teulieres C., Blain I., Bramley P.M., Schuch W. Using antisense RNA to study gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes // *BioTechnology*. 1991. V. 9. P. 635-639.
31. Chance B., Maehly A.C. Assays catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. N.Y.: Academic Press, 1955. P. 764-775
32. Campos N., Boronat A. Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase // *The Plant Cell*. 1995. V. 7. P. 2163-2174.
33. Choi D., Ward B.L., Bostock R.M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid // *Plant Cell*. 1992. V. 4. P. 1333-1344.
34. Chye M.L., Tan C.T., Chua N.H. Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: hmg1 and hmg3 are differentially expressed // *Plant Mol. Biol.* 1992. V.19. P. 473-484.
35. Cornelissen M., Vandewiele M. Both RNA level and translation efficiency are reduced by anti-sense RNA in transgenic tobacco // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 833-843.
36. Delauney A.J., Tabaeizadeh Z., Verma D.P.S. A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 4300-4304.
37. Denbow C.J., Lang C.L., Cramer C.L. The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductases. Sequence, microsomal targeting, and glucosylation // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 9710-9715.
38. Ecker J.R., Davis R.W. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 5372-5376.
39. Enjuto M., Balsells L., Campos N., Caelles C., Arro M., Boronat A. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A reductase genes, wich encode microsomal forms of the enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 927-931.
40. Enjuto M., Lumberas V., Marin C., et. al. Expression of the *Arabidopsis* HMG2 gene, encoding 2-hydroxy-3-metilglutaril coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues.

41. Fulton D., Kroon P., Matern U., Threlfall D., Whitehead J. Inhibition of phytosterol biosynthesis in elicitor-treated cultures of *Ammi-Majus* // *Phytochemistry*. 1993. V. 34. P. 139-145.
42. Gil G., Faust J.R., Chin D.J., Goldstein J.L., Brown M.S. Membrane-bound domain of HMG-CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme // *Cell*. 1985. V. 41. P. 249-258.
43. Godoy-Hernandes G.C., Chappell J., Devarenne T.P. et al. Antisense expression of *hmg1* from *Arabidopsis thaliana* encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, reduces isoprenoid production in transgenic tobacco plants // *J. Plant Physiol.* 1998. V. 153. P. 415-424.
44. Goodwin T., Mercer E. Regulation of sterol and carotenoid metabolism in germinating seedlings // *Biochem. Soc. Symp.*, 1963. V. 24. P. 37-41.
45. Harborne J. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids* (Harborne, J., and Thomas-Barberan, F., eds). Clarendon Press, Oxford, 1991. P. 399-426.
46. Keun K.K., Yamashita H., Sawa Y., Shibata H. A high activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in chloroplasts of *Stevia rebaudiana* Bertoni // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996. V. 60. P. 685-686.
47. Lange B.M., Severin K., Bechthold A., Heide L. Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase for shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures // *Planta*. 1998. V. 316. P. 234-241.
48. Learned R.M. Light suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* 1996. V. 110. P. 645-655.
49. Learned R.M., Fink G.R. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 2779-2783.
50. Learned R.M., Connolly E.L. Light modulates the spatial patterns of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 1997. V. 11. P. 499-511.
51. Lichtenthaler H., Schwender J., Disch A., Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plants chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway // *FEBS Lett.* 1997. V. 400. P. 271-274.
52. Lumberras V., Campos N., Boronat A. The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* *hmg1* gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase isoform with an extended N-terminal region // *Plant J.* 1995. V. 8. P. 541-549.

53. Matousek J., Schroder A.R., Trnena L. et al., Inhibition of viroid infection by antisense RNA expression in transgenic plants // *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. 1994. V. 375. P. 765-777.
54. Mc Gaskill D., Croteau R. Isoprenoid synthesis in peppermint (*Mentha piperita*): development of a model system for measuring flux of intermediates through the mevalonic acid pathway in plants // *Biochem. Soc. Transactions*. 1995. V. 23. P. 290.
55. Pestka S., Daugherty B.L., Jung V., Hotta K., Pestka R.K. Anti-mRNA: specific inhibition of translation of single mRNA molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. P. 7525-7528
56. Re E.B., Jones D., Learned R.M. Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG-CoA reductase expression in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 1995. V. 7. P. 771-784.
57. Roger S., Shah P. Compartmentation of terpenoid biosynthesis in green plants and proposed route of acetyl-coenzyme A synthesis in maize chloroplasts // *Biochem. J*. 1969. V. 114. P. 395-405.
58. Rohmer M., Khani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria - a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate // *Biochem. J*. 1993. V. 295. P. 517-524.
59. Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahn H. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis // *J. Amer. Chem. Soc*. 1996. V. 118. P. 2564-2568.
60. Schulze-Siebert D., Schultz G. Formation of aromatic amino acids and valine from $^{14}\text{CO}_2$ or 3-[U- ^{14}C]-phosphoglycerate by isolated intact spinach chloroplasts. Evidence for a chloroplastic 3-phosphoglycerate \rightarrow 2-phosphoglycerate-phosphoenolpyruvate-pyruvate pathway // *Plant Sci*. 1989. V. 59. P. 167-174.
61. Skalnik D.G., Narita K., Kent, Simoni R.D. The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated regulation onto β -galactosidase // *J. Biol. Chem*. 1988. V. 263. P. 6836-6841.
62. Spurgeon S., Porter J. Biosynthesis of isoprenoid compounds. John Wiley and Sons, New York. 1981. P. 1-46.
63. Suzuki M., Kamide Y., Nagata N., et.al. Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels // *Plant J*. 2004. Vol. 37. P. 750-761.

64. Takatsuji H., Nishino T., Miki I., Katsuki H. Studies on isoprenoid biosynthesis with bacterial intact cell // *Biochem. a. Biophys. Res. Comm.* 1983. V. 110. P. 187-193.
65. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test // *Analytic. Biochem.* 1978. Vol. 86. P. 287–297.
66. Wentzinger L.F., Bach T.J., Hartmann M-A. Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 130. P. 334–346
67. Zhou D., White R. Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli* // *Biochem. J.* 1991. V. 273. P. 627-634.